

**Avaliação do tratamento a curto prazo com  
ouabaína na reatividade vascular de rato.**

Alessandra Simão Padilha

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Abril de 2007

# **Avaliação do tratamento a curto prazo com ouabaína na reatividade vascular de rato.**

**Alessandra Simão Padilha**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em \_\_\_\_\_, por:

---

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Orientador, UFES.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon - PPGCF, UFES.

---

Prof. Dr. José Geraldo Mill - PPGCF, UFES.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleci Menezes Moreira – CCS-U, UNIPAMPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Venturini Rossoni – ICB, USP.

Coordenador da PPGCF:

---

Prof. Dr. José Geraldo Mill  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, Abril de 2007

Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a  
fazer outras maiores perguntas.

(Guimarães Rosa, *Grande sertão: veredas*)

Dedico este trabalho à minha mãe, ao meu pai e aos meus irmãos, Fabíola, Júnior e Maroun. Em especial, à pequena Beatriz – já tão amada e esperada por nós.

Ao Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, meu particular agradecimento, por toda orientação e ensinamentos preciosos. Acima de tudo, pela grande amizade construída ao longo desses anos. Muito obrigada por ter me despertado para o fantástico mundo da pesquisa, apoiando-me e ensinando-me – tal como um pai – a trilhar os caminhos dessa longa jornada.

## **Agradecimentos**

A Deus, por todas as graças e bênçãos que tenho recebido ao longo da minha vida, em especial a maior de todas: Beatriz!

Quero agradecer, especialmente, à minha família, meu porto seguro: à minha mãe Zarría, ao meu pai Sérgio, que mesmo não presente neste plano, vela por mim; e aos meus irmãos Fabíola, Maroun e Júnior. É no apoio e amor incondicional de vocês por mim que eu crio forças para sempre dar um passo mais adiante. Obrigada também aos meus cunhados Helder, Elizangela e Ivone, e aos meus amados sobrinhos Gabriela, Juliana, Luisa e Vitor.

Aos Professores Doutores Victoria Cachofeiro e Vicente Lahera, por terem me acolhido tão gentilmente e amorosamente em Madrid e em seu laboratório na Facultad de Medicina da Universidad Complutense de Madrid. Meus sinceros agradecimentos pela atenção especial nos meus momentos de dificuldade. Não poderia deixar de agradecer, ainda, à pequena Ana e à Olga, por toda a hospitalidade.

À Profa. Dra. Mercedes Salaices, pelo carinho, confiança e amizade com que me recebeu e me orientou em seu laboratório na Facultad de Medicina da Universidad Autónoma de Madrid. Agradeço, também, à Profa. Dra. Maria Jesus Alonso, por todos os conselhos que foram de grande valor neste trabalho.

À Profa. Dra. Ivanita Stefanon, pela amizade, confiança e pela ajuda concedida durante esses anos.

À Profa. Dra. Cleci, grande parceira de trabalho e amiga em todas as horas, pelo incentivo e ensinamentos, dentre os quais, dois muito valiosos: a serenidade e a persistência. Não poderia deixar de agradecer aqui, também, ao Luiz, pela ajuda que prestou enquanto estive conosco, e ao “Pablito”, por tornar o ambiente do laboratório ainda mais alegre.

Aos meus grandes amigos, Fabiana & Eduardo e Ágata, que estiveram ao meu lado, mesmo quando a distância era grande. É nas horas mais difíceis que reconhecemos os nossos amigos!

A Giulia e ao Franck, que se tornaram excelentes amigos, especialmente após nossa convivência em Madrid. Muito obrigada pela paciência, carinho, compreensão e, sobretudo, pelo apoio nos momentos mais difíceis por que passei. Serei eternamente grata por isso!

Ao Élio, pela presença carinhosa ao meu lado, tornando mais branda essa longa jornada.

Aos amigos e companheiros do LEMC, que partiram para outros rumos e deixarão sempre saudades: Válber, Carlos, Carmem, Matheus, Fabíola, Diego, Rosemberg, Patrícia, Rita, Fabiano, Silvio, Ana Paula, Leonardo, Flávia, Adriana.

Aos amigos e companheiros do LEMC, novos e antigos, com os quais tenho aprendido e ainda vou aprender muito: Karina, Juliana, Luciana, Edna, Aurélia, Fernanda, Saulo, Miriam, Lorena, Thaís, Gabriel, Altemar, Kelly, Vivi, Lili, Guilherme, Priscila, Patrick, Rogério, Núbia, Nelson, Aaron, Lélia.

À todas "*las chicas guapas de L4*", que me prestaram grande ajuda experimental e técnica e tornaram a minha passagem por Madrid mais alegre e inesquecível: Ana Briones, Yoli, Ana Garcia, Amada, Raquel, Marta e Mayte. Muito obrigada pelo carinho e amizade com que me receberam. *Las echaré de menos!*

À "*las chicas de la UCM*": Natália, Maria e Bea. Obrigada pela acolhida em Madrid e por toda a amizade dispensada!

A todos os demais amigos do PPGCF, pela amizade e pelos ótimos momentos: Diego, Marcelo, Mário, Rodrigo, Pedro & Daniel, e a tantos outros que torna o nosso programa de pós-graduação mais alegre! Em especial, nossos *happys* de sexta à tardinha, depois de um dia inteiro de experimento. Que ainda possamos brindar muitas outras sextas!

Aos professores do PPGCF, pelos ensinamentos, pela ajuda desinteressada e pela amizade!

Ao secretário Fonseca, por ter muitas vezes disponibilizado seu tempo, sempre corrido, e me ajudado com as questões burocráticas. À Cláudia, à Maria, à equipe do biotério e a todos os demais funcionários do PPGCF, muito obrigada pela inestimável ajuda técnica.

À CAPES e à FAPES/FUNCITEC, pelo apoio financeiro.







## **SUMÁRIO**

<b>Lista de Esquemas, Tabelas e Figuras</b> .....	12
<b>Resumo</b> .....	19
<b>Abstract</b> .....	21
<b>1. Introdução</b> .....	23
<b>1.1. Disfunção endotelial na hipertensão</b> .....	24
<b>1.2. A bomba de sódio e sua relação na hipertensão</b> .....	29
<b>1.3. Ouabaína endógena</b> .....	32
1.3.1. Hipertensão induzida pelo tratamento crônico com ouabaína.....	39
<b>2. Objetivos</b> .....	44
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	44
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	44
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	46
<b>3.1. Experimentos agudos</b> .....	46
3.1.1. Animais experimentais .....	46
3.1.2. Experimentos agudos <i>in vivo</i> .....	46
3.1.2.1. Metodologia para as preparações <i>in vivo</i> .....	46
3.1.2.2. Protocolos experimentais para as preparações <i>in vivo</i> .....	46
3.1.3. Experimentos agudos <i>in vitro</i> .....	47
3.1.3.1. Avaliação dos valores pressóricos.....	47
3.1.3.2. Metodologia empregada para estudos de reatividade vascular no leito vascular caudal .....	48
3.1.3.3. Protocolos experimentais para as preparações <i>in vitro</i> .....	48
<b>3.2. Experimentos crônicos</b> .....	50
3.2.1. Animais experimentais .....	50
3.2.2. Medidas de pressão arterial .....	50
3.2.3. Metodologia empregada para estudo de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência .....	50
3.2.4. Protocolos experimentais .....	52
3.2.5. Western Blot.....	55
3.2.5.1. Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico e da ciclooxigenase-2.....	55
3.2.5.1.1. Eletroforese e transferência das amostras.....	55

3.2.5.1.2. Incubação com os anticorpos e detecção das isoformas.....	56
<b>3.3. Expressão dos resultados e análises estatísticas.....</b>	<b>57</b>
<b>3.4. Fármacos e reagentes utilizados .....</b>	<b>58</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1. Experimentos agudos <i>in vivo</i>.....</b>	<b>61</b>
4.1.1. Dados ponderais, valores pressóricos e de frequência cardíaca em animais anestesiados. ....	61
4.1.2. Efeito da ouabaína na pressão arterial de ratos anestesiados.....	62
4.1.3. Efeito do bloqueio dos receptores AT1 para angiotensina II sobre as ações da ouabaína na pressão arterial .....	66
<b>4.2. Experimentos agudos <i>in vitro</i> .....</b>	<b>70</b>
4.2.1. Dados ponderais, valores pressóricos e de frequência cardíaca em animais acordados. ....	70
4.2.2. Resposta vasoconstritora à fenilefrina e resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina .....	70
4.2.3. Efeito da administração aguda de 1µM ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito vascular caudal .....	72
4.2.4. Modulação do endotélio no efeito da ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina .....	75
4.2.5. Análise da participação da angiotensina II nos efeitos da ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina .....	81
<b>4.3. Experimentos crônicos .....</b>	<b>86</b>
4.3.1. Valores pressóricos, de frequência cardíaca e de massa corporal ....	86
4.3.2. Respostas vasculares ao KCl, a acetilcolina e à fenilefrina.....	88
4.3.3. Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina. ....	91
4.3.4. Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina e dos receptores AT1 sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina. ....	92
4.3.5. Efeito da inibição da NOS sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	95
4.3.6. Efeito da inibição da COX sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina. ....	97

4.3.7. Efeito temporal da resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina .	99
4.3.8. Efeito do tratamento crônico com ouabaína sobre a atividade funcional da Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> , ATPase sensível à ouabaína.....	101
4.3.9. Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico e da COX-2.....	103
<b>5. Discussão</b> .....	105
<b>5.1. Estudos agudos</b> .....	105
5.1.1. Efeito da ouabaína na pressão arterial de ratos anestesiados.....	106
5.1.2. Efeito da ouabaína na reatividade vascular <i>in vitro</i> .....	109
<b>5.2. Estudos crônicos</b> .....	114
<b>6. Conclusão</b> .....	123
<b>6.1. Estudos agudos</b> .....	123
6.1.1. Estudos agudos <i>in vivo</i> .....	123
6.1.2. Estudos agudos <i>in vitro</i> .....	123
<b>6.2. Crônicos</b> .....	124
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	126





## **LISTA DE ESQUEMAS, TABELAS E FIGURAS**

**Lista de Esquemas, Tabelas e Figuras**

	Página
<b>Esquema 1.</b> Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS).	27
<b>Esquema 2.</b> Modelo do plasmerosoma (PRS) e o mecanismo envolvido no aumento de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) transiente induzido por baixas doses de ouabaína em células musculares lisas (CML).	37
<b>Esquema 3.</b> Esquema demonstrando os principais componentes da preparação para o estudo de vasos de resistência isolados, desenvolvido por Mulvany & Halpern (1977).	51
<b>Tabela 1.</b> Valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca de ratos Wistar, WKY e SHR, anestesiados.	61
<b>Tabela 2.</b> Valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca de ratos Wistar, WKY e SHR, acordados.	70
<b>Tabela 3.</b> Valores de EC50 e resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias caudal de ratos Wistar, WKY e SHR.	73

**Tabela 4.** Valores de EC50 e resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias caudal de ratos Wistar ( $n = 9$ ), WKY ( $n = 5$ ) e SHR ( $n = 8$ ) antes e após perfusão com  $1 \mu\text{M}$  de ouabaína. 74

**Tabela 5.** Valores de EC50 e resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ , mmHg) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias caudal de ratos Wistar ( $n = 9$ ), WKY ( $n = 5$ ) e SHR ( $n = 8$ ) antes (E+) e após lesão endotelial (E-). 75

**Tabela 6.** Efeito da remoção do endotélio (E-) e dos tratamentos com Captopril (CAP), Losartan (LOS) e L-NAME (LNA) na  $R_{\text{max}}$  (%) e EC50 à fenilefrina em artéria mesentérica de ratos controle (CT) e tratados por 15 dias com ouabaína (OUA). 90

**Tabela 7.** Efeito da incubação com tetraetilamônio (TEA, 2 mM) sobre os valores de EC50 e  $R_{\text{max}}$  à fenilefrina em artérias mesentéricas previamente incubadas com L-NAME (LNA,  $100 \mu\text{M}$ ) + indometacina (Indo,  $10 \mu\text{M}$ ), de ratos controle (CT) e tratados com ouabaína (OUA). 99

**Tabela 8.** Valores de resposta máxima ( $R_{\text{max}}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) à noradrenalina uma e duas horas após realização da primeira curva concentração-resposta a este agonista alfa-adrenérgico em artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle, Ouabaína, Losartan e Ouabaína + Losartan. 101

**Figura 1.** Valores de pressão arterial sistólica (PAS) em ratos Wistar (A, N=5), WKY (B, N=7) e SHR (C, N=6) anestesiados com uretana, antes (barras claras) e após (barras pontilhadas) 60 minutos da administração de 18 µg/Kg de ouabaína. 63

**Figura 2.** Valores de pressão arterial diastólica (PAD) em ratos Wistar (A, N=5), WKY (B, N=7) e SHR (C, N=6) anestesiados com uretana, antes (barras claras) e após (barras pontilhadas) 60 minutos da administração de 18 µg/Kg de ouabaína. 64

**Figura 3.** Valores de frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar (A, N=5), WKY (B, N=7) e SHR (C, N=6) anestesiados com uretana, antes (barras claras) e após (barras pontilhadas) 60 minutos da administração de 18 µg/Kg de ouabaína. 65

**Figura 4.** Valores de pressão arterial sistólica (PAS) em ratos Wistar (A, N=4), WKY (B, N=4) e SHR (C, N=5) anestesiados com uretana, antes (barras claras) e após (barras pontilhadas) 30 minutos da administração de losartan e após (barras pontilhadas) após 60 minutos da administração de 18 µg/Kg de ouabaína. 68

**Figura 5.** Valores de pressão arterial diastólica (PAD) em ratos Wistar (A, N=4), WKY (B, N=4) e SHR (C, N=5) anestesiados com uretana, antes (barras claras) e após (barras pontilhadas) 30 minutos da administração de losartan e após (barras pontilhadas) após 60 minutos da administração de 18 µg/Kg de ouabaína. 69

**Figura 6.** Mudanças na pressão de perfusão média ( $\Delta$ MPP; mmHg), induzidas por doses crescentes de fenilefrina, no leito vascular caudal de animais Wistar (n=26, quadrados cheios), WKY (n=14, círculos cheios) e SHR (n=26, triângulos cheios). 71

**Figura 7.** Mudanças na média da pressão de perfusão ( $\Delta$ MPP; mmHg), induzidas por doses crescentes de fenilefrina, no leito vascular caudal de animais Wistar (A, n = 9), WKY (B, n = 5) e SHR (C, n = 8) antes (símbolos cheios) e após (símbolos vazios) perfusão por 60 minutos com ouabaína. 74

**Figura 8.** Mudanças na média da pressão de perfusão ( $\Delta$ MPP; mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina no leito vascular caudal de ratos Wistar (A, n = 9 - 7), WKY (B, n = 5 - 5) e SHR (B, n = 7 - 5), nas condições com endotélio (símbolos cheios) e após lesão endotelial com CHAPS (símbolos vazios). 78

**Figura 9.** Mudanças na média da pressão de perfusão ( $\Delta$ MPP; mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina após lesão endotelial com CHAPS no leito vascular caudal de ratos Wistar (A, n = 7), WKY (B, n = 5) e SHR (B, n = 5), antes (símbolos cheios) e após (símbolos vazios) perfusão por 60 minutos com 1  $\mu$ M de ouabaína. 80

**Figura 10.** Mudanças na média da pressão de perfusão ( $\Delta$ MPP; mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina no leito vascular caudal de ratos Wistar (A, n = 6) e WKY (B, n = 4) antes (símbolos cheios) e após (símbolos vazios) perfusão por 60 minutos com losartan ( $10^{-4}$ M). 83

**Figura 11.** Mudanças na média da pressão de perfusão ( $\Delta$ MPP; mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina no leito vascular caudal de ratos Wistar (A, n = 7), WKY (B, n = 6) e SHR (C, n = 12) antes (símbolos cheios) e após (símbolos vazios) co-perfusão por 60 minutos com losartan ( $10^{-4}$ M) e ouabaína (1  $\mu$ M). 85

**Figura 12.** Valores de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg), pressão arterial diastólica (PAD, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de ratos Wistar controle (CT, n = 10) e tratados por 15 dias com ouabaína (OUA, n = 10). 87

**Figura 13.** Relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$ M) em artérias mesentéricas de resistência pré-contraídas com fenilefrina em ratos controle (CT, n = 11) e tratados com ouabaína (OUA, n = 9). 89

- Figura 14.** Respostas contráteis induzidas por fenilefrina, em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 8) e Ouabaína (OUA, n = 7). 89
- Figura 15.** Efeito da remoção mecânica do endotélio (E-) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 8 - 7) e tratados por 15 dias com ouabaína (OUA, n = 7 - 7). 92
- Figura 16.** Resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 6) e tratados por 15 dias com ouabaína (OUA, n = 7) antes e após incubação com captopril (Cap, 10 µM). 93
- Figura 17.** Resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 7) e tratados por 15 dias com ouabaína (OUA, n = 7) antes e após incubação com Losartan (Los, 10 µM). 94
- Figura 18.** Resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 9) e tratados por 15 dias com ouabaína (OUA, n = 7) antes e após incubação com L-NAME (LNA, 100 µM). 96
- Figura 19.** Efeito da pré-incubação com L-NAME (LNA, 100µM) e Indometacina (Indo, 10µM) e com L-NAME (LNA, 100µM), Indometacina (Indo, 10µM) e TEA (2mM) nas curvas concentração-resposta à fenilefrina em artéria mesentérica de ratos controle (CT, n = 6 ) e tratados por 15 dias com ouabaína (OUA, n = 6). 98

**Figura 20.** Controle temporal das curvas concentração-resposta à fenilefrina artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 8) e ouabaína (OUA, n = 7). 100

**Figura 21.** A. Curva de relaxamento ao KCl na ausência e na presença de ouabaína (OUA 100  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 5) e ouabaína (OUA, n = 5). Figura C representa a diferença de área abaixo da curva (dAUC) do relaxamento ao KCl na ausência e presença de ouabaína. 103

**Figura 22.** (A) Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e (B) Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica da COX-2 em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle e ouabaína. Painel superior mostra as bandas de *Western blots* representativas da expressão da eNOS e  $\alpha$ -actina, e da COX-2 e  $\alpha$ -actina em artérias mesentéricas de ratos controle e ouabaína. 104

**RESUMO**

A ouabaína (OUA), um inibidor da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, está presente em concentrações nanomolares (nM) no plasma de vários mamíferos. Em ratos hipertensos, concentrações nM dessa substância, de forma aguda, são capazes de aumentar a pressão arterial (PA) e a sensibilidade do músculo liso vascular à agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, via liberação de angiotensina II (Ang II). No entanto, não se sabe se o efeito de concentrações maiores de OUA já conhecidas por aumentar a PA e amplificar a reatividade vascular a esses agonistas, tanto em ratos normotensos quanto em hipertensos, também são dependentes da liberação de Ang II. Por outro lado, os efeitos agudos da OUA parecem ser distintos dos seus efeitos crônicos. A hipertensão induzida por administração crônica de OUA por 5 semanas é acompanhada de alterações compensatórias dos fatores endoteliais sobre a reatividade vascular. Porém, ainda não se sabe se essas alterações já se iniciam em estágios mais precoces dessa hipertensão.

Neste estudo avaliamos as ações agudas de 18  $\mu$ g/Kg (*i.v.*) de OUA na PA de ratos hipertensos (SHR) e normotensos (Wistar e WKY), bem como os efeitos de 1  $\mu$ M de OUA na reatividade vascular à fenilefrina (FE) no leito vascular caudal desses animais. Também investigamos, em ratos Wistar, o efeito do tratamento crônico por 15 dias com OUA (25  $\mu$ g/Kg) sobre a resposta a contrátil à FE em artérias mesentéricas de resistência (AMR).

A administração de 18  $\mu$ g/Kg de OUA elevou a pressão arterial diastólica (PAD) e a pressão arterial sistólica (PAS) em ratos Wistar e SHR, mas não em WKY. A administração de losartan preveniu o efeito pressor da OUA sobre a PAD de ratos Wistar, mas não alterou os demais parâmetros. No leito vascular caudal dos ratos Wistar, WKY e SHR, 1  $\mu$ M de OUA foi capaz de aumentar a resposta à FE. Esse aumento foi atribuído à liberação local de Ang II, já que a co-perfusão com Losartan e OUA, não modificou a resposta à FE. Nos SHR, somente parte dessa resposta foi abolida pela administração de losartan. Esses dados sugerem que a OUA amplifica a resposta à FE em ratos normotensos, via liberação de Ang II. Já nos hipertensos, outras vias endoteliais, além da Ang II parecem estarem envolvidas.

O tratamento crônico com OUA por 15 dias elevou a PAS, PAD e frequência cardíaca em ratos Wistar. No entanto, a reatividade vascular à FE em AMR foi similar em ratos tratados e não tratados. A incubação das AMR com L-NAME aumentou a resposta a FE nos dois grupos, embora esse efeito tenha sido maior nos

ratos tratados. Essa resposta não foi acompanhada de aumento na expressão protéica da eNOS, nem de alterações no relaxamento à acetilcolina. A co-incubação de Indometacina e L-NAME deslocou a curva concentração-resposta à FE para a esquerda nos ratos não tratados similar àquele obtido somente com L-NAME, sugerindo a ausência da participação dos prostanóides em resposta à FE. Já em ratos tratados, a incubação dos dois fármacos não desviou a curva concentração-resposta à FE, indicando a participação de prostanóides vasoconstritores. Nos ratos tratados esse resultado foi acompanhado de aumento na expressão protéica de COX-2. A pré-incubação das artérias com Indometacina, L-NAME e TEA, promoveu um desvio adicional da curva concentração-resposta a FE somente em AMR de ratos não tratados. Esses dados sugerem que estágios iniciais da hipertensão induzida por OUA são acompanhados de aumento da liberação de NO e prostanóides vasoconstritores, e redução de EDHF, que em conjunto, apesar de não modificar a reatividade vascular à FE, podem contribuir para a manutenção da hipertensão induzida por OUA.

## **ABSTRACT**

Ouabain (OUA), an inhibitor of the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase (NKA), is an endogenous compound present in nanomolar concentration in the plasma of several mammals. In several models of hypertension plasma OUA concentration is increased suggesting an association to the genesis and/or maintenance of hypertension. In this study pressor changes resulting from the acute administration of OUA 18µg/Kg (*i.v.*) (~30 nmol/Kg) were evaluated in normotensive (Wistar and WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). At the same time, were evaluated the effects of 1µM OUA in the reactivity of the tail vascular bed to phenylephrine (PHE) in Wistar, WKY and SHR. On the other hand, the vascular reactivity and the role of endothelial factors in mesenteric resistance arteries (MRA) in 15 day chronic ouabain treated rats were also investigated.

The systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure were increased by the acute administration of 18µg/Kg of OUA in Wistar and SHR, but not in WKY. The pretreatment with losartan (10 mg/kg), an inhibitor of AT1 receptors, only blocked the effects of OUA in the DBP in Wistar, without altering the other parameters.

In the tail vascular bed, the perfusion with OUA in the presence of endothelium (E+) increased the vascular reactivity of PHE in the all groups. In the absence of functional endothelium, the effects of OUA were abolished. However, in E+, after perfusion with losartan (10<sup>-4</sup>M) plus OUA, the increase of response to PHE by OUA was totally abolished in Wistar and WKY, and partially in SHR.

The chronic ouabain treatment for 15 days increased SBP, DBP and heart rate. However, this treatment did not change the pressor response to PHE. The endothelium removal or the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor (L-NAME, 10<sup>-5</sup>M) increased the responses to α-adrenergic agonists. The endothelial modulation was similar in treated and untreated rats, but the L-NAME effects were more increased in MRA in treated rats. Endothelial NOS expression and relaxation of acetylcholine remained unaltered after ouabain treatment.

To evaluate the prostanoids participation in the response to PHE, the MRA were incubated with Indometacin (10<sup>-4</sup>M), an inhibitor of cyclooxygenase, plus L-NAME. In the same protocol, EDHF participation was investigated, after incubation of MRA with Indometacin and L-NAME plus TEA (2mM), an inhibitor of calcium activated potassium channels.

Indometacin plus L-NAME, shifted leftward the concentration-response curves to PHE in MRA from untreated rats and this response was similar when compared

the leftward shift after incubation only L-NAME. However, in MRA of the treated rats, the co-incubation with Indometacin plus L-NAME did not altered concentration-response curves to PHE. This result was accompanied by increase in the COX-2 expression. TEA shifted the PHE curves further leftward only in MRA from untreated rats.

In conclusion, these results suggest that the increase in the DBP in Wistar after 18µg/Kg OUA depends of angiotensin II. In the tail vascular bed of normotensive and hypertensive rats, the acute administration of 1µM OUA, increased of PHE pressor response. The endothelium modulates this response by releasing angiotensin II in normotensive rats, but in hypertensive rats, other factors seem to be involved besides the angiotensina II.

The chronic ouabain treatment for 15 days modified the participation of endothelial factors in response to PHE in MRA, by the increase liberation of NO and prostanoids, and impairment of EDHF release. This was accompanied by an increased COX-2 expression. Although this balance avoids changes in the PHE concentration-response curves these vascular changes might contribute to maintain the ouabain-induced hypertension.

# **INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução

A hipertensão arterial constitui-se num dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais, sendo que essas doenças atualmente são responsáveis por um grande percentual de morbi-mortalidade em países industrializados. Estima-se que 20% da população mundial apresente hipertensão arterial, sendo que no Brasil esse percentual pode chegar em torno de 40% em algumas regiões do país (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial).

De acordo com os níveis tensionais em indivíduos adultos, são considerados normais aqueles valores de pressão arterial sistólica abaixo de 130 mmHg, e de pressão arterial diastólica aqueles abaixo de 85 mmHg. Valores tensionais acima desses mencionados são classificados como hipertensão. No entanto, o diagnóstico de hipertensão deve ser cauteloso e outros fatores considerados de risco, além dos níveis tensionais altos, devem ser levados em consideração, como lesão de órgãos-alvo e doenças associadas, visto que a hipertensão arterial é uma doença multifatorial.

Dentre os diversos fatores que contribuem para a gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial essencial incluem-se as alterações nos parâmetros hemodinâmicos com modificações no débito cardíaco e resistência vascular periférica; alterações funcionais como aumento da atividade simpática e do sistema renina-angiotensina; resistência à insulina; a hereditariedade e a raça (Freis *et al*, 1973; Folkow, 1982; Harrap, 1994). Também se inclui a obesidade, o tabagismo, o sedentarismo e o alto consumo de sal (Bakris & Mensah, 2002). Todos esses fatores podem contribuir para desencadear e/ou agravar o processo hipertensivo.

A pressão arterial é uma entidade física e depende, portanto, de fatores físicos como volume sanguíneo e capacitância da circulação, sendo assim, determinada pelo produto do débito cardíaco e da resistência vascular periférica. No entanto, são alterações na resistência vascular os principais responsáveis por modificações da pressão arterial (Folkow, 1982).

Grande parte da resistência vascular periférica é atribuída às pequenas artérias de resistência. Essas artérias contribuem passivamente e ativamente para a manutenção da resistência basal e para o controle do fluxo sanguíneo durante alterações hemodinâmicas (Mulvany, 2002; 2003). Pelo menos, três importantes

componentes modificam claramente a resistência vascular: a estrutura, a mecânica e a função dos vasos sanguíneos (Intengan & Schiffrin, 2000). Alterações estruturais, como redução do diâmetro luminal e espessamento de parede arterial, alterações mecânicas, como redução da elasticidade, bem como modificações nas respostas vasoconstritora e vasodilatadora, dependentes do endotélio, podem repercutir em aumento da resistência e conseqüentemente, hipertensão arterial (Intengan & Schiffrin, 2000; Mulvany, 2002; 2003).

### **1.1. Disfunção endotelial na hipertensão**

O endotélio vascular, por ser capaz de produzir e liberar substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras interfere diretamente no tônus vascular e, portanto, na resistência vascular (Rubanyi, 1993). Dentre as substâncias que promovem o relaxamento do músculo liso vascular incluem-se a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), o óxido nítrico (NO) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Moncada *et al*, 1977; Furchgott & Zawadzki, 1980; Palmer *et al*, 1987; Félétou & Vanhoutte, 1988). Já entre aquelas capazes de promover contração do músculo liso vascular podemos citar a angiotensina II, endotelina-1 e os metabólitos derivados da via do ácido araquidônico como tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ), prostaglandinas  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ) e  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), além dos ânions superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (Rubanyi & Vanhoutte, 1986; Kifor & Dzau, 1987; Yanagisawa *et al*, 1988; Frolich & Forstermann, 1989; Vanhoutte, 1993).

Muitas dessas substâncias regulam o crescimento e apoptose das células musculares lisas, além de interferirem também na agregação plaquetária e a adesão de leucócitos (Moncada *et al*, 1977; Kubes *et al*, 1991; Moncada *et al*, 1991; Rubanyi, 1993). Deste modo, o endotélio possui uma participação essencial e ativa no controle e manutenção da pressão arterial. Nesse sentido, é fácil compreender que modificações na sua função, como, por exemplo, aumento da síntese e/ou liberação de fatores vasoconstritores ou fatores de crescimento podem promover aumento de resistência vascular e conseqüentemente, da pressão arterial. Modificações desse tipo já foram observadas por muitos pesquisadores nos processos hipertensivos levando à denominação de disfunção endotelial (Panza *et al*, 1990; Taddei *et al*, 1993; Rizzoni *et al*, 1996; Rossi *et al*, 1997).

Dentre as alterações funcionais do endotélio observadas na hipertensão, incluem-se modificações da síntese de NO. Alguns trabalhos demonstram uma

redução da síntese de NO na hipertensão, enquanto outros demonstram um aumento desse vasodilatador como um mecanismo compensatório (Dohi *et al*, 1990; Alexander *et al*, 1999; Briones *et al*, 1999, 2002; Rossoni *et al*, 2002b; Chang *et al*, 2002). No entanto, há pesquisadores que relatam que a síntese e liberação de NO parecem não estar alteradas na hipertensão, porém sua biodisponibilidade está reduzida devido ao aumento da formação de ânions superóxidos, que inativam o NO, reduzindo sua ação vasorelaxante e promovendo vasoconstrição (Gryglewski *et al*, 1986; Suzuki *et al*, 1995).

Outras alterações ainda relacionadas ao NO, dizem respeito à expressão e atividade das isoformas da sintase do óxido nítrico (NOS) que também poderiam contribuir para a disfunção endotelial observada na hipertensão. Porém, Briones e colaboradores (2002) demonstraram que em artérias cerebrais de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não havia um prejuízo na produção endotelial de NO pela ativação da NOS, no entanto, a hipertensão induzia uma *up-regulation* da expressão basal da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS).

Já estudos de Nava e colaboradores (1995 e 1998) demonstraram, em células endoteliais cardíacas e em artéria mesentérica de resistência de SHR, que tanto a expressão como a atividade da isoforma constitutiva da NOS estavam elevadas nesses animais quando comparados aos seus controles normotensos. No entanto, os níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) nos animais hipertensos não foram diferentes em comparação aos normotensos, indicando que, mesmo havendo um maior produção de NO, pelo aumento da expressão e atividade da NOS constitutiva, este não é biologicamente ativo suficiente para estimular a formação de GMPc e manter um adequado tônus vasodilatador dependente de NO. Esses dados corroboram a teoria de que, nesse modelo de hipertensão, a síntese de NO está normal ou até mesmo incrementada, embora sua degradação esteja elevada devido ao aumento na produção de radicais livres como será descrito a seguir.

Um outro fator quem têm ganhado relevância na literatura e parece estar implicado na hipertensão arterial é a presença de um inibidor endógeno da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) produzido pelas células endoteliais, o N(G), N(G`)-dimetilarginina (ADMA). Seus níveis plasmáticos correlacionam-se positivamente com os níveis pressóricos e inversamente com o relaxamento

endotélio-dependente, constituindo-se também como fator de risco cardiovascular (Boger *et al*, 1998; Achan *et al*, 2003; Dayoub *et al*, 2003; Kielstein *et al*, 2004).

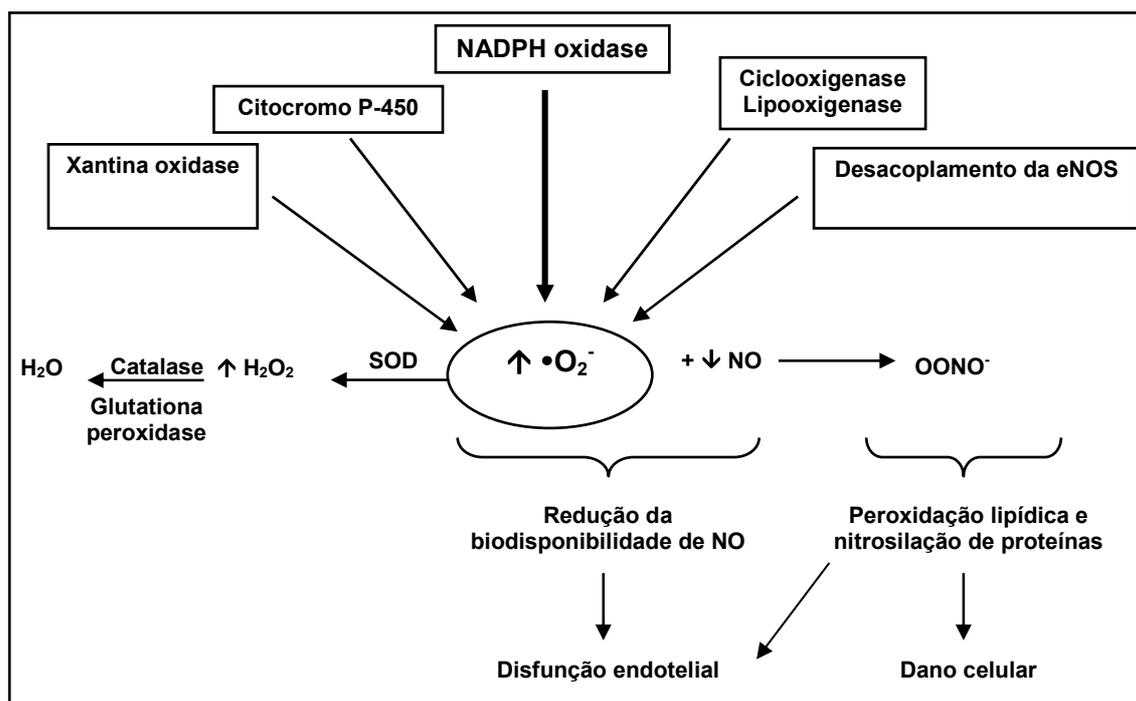
A disfunção endotelial resulta também de outras alterações além daquelas apresentadas na via do NO. O aumento do estresse oxidativo já está bem estabelecido como um fator presente na hipertensão arterial.

Durante o metabolismo celular aeróbico, normalmente são produzidas várias substâncias eletricamente instáveis, potencialmente reativas com moléculas biológicas capazes de causar oxidação e dano irreversível à célula. Estas substâncias são denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO) e apresentam um elétron não pareado na última camada (ou seja, elétrons que ocupam sozinhos a última órbita atômica). A produção normal de ERO no metabolismo celular é proveniente da geração oxidativa de energia pela cadeia mitocondrial, de radicais livres pelo citocromo P-450, do mecanismo de defesa dos fagócitos que produzem radical superóxido para causar morte em microorganismos, entre outros mecanismos associados. Apesar de o organismo gerar grandes quantidades de ERO, em contrapartida também sintetiza substâncias antioxidantes que inativam as ERO, havendo, portanto, um equilíbrio desse sistema. Um dos antioxidantes mais predominantes no sistema vascular é a enzima denominada superóxido dismutase (SOD), que inativa os ânions superóxidos gerados (Fridovich, 1978). O estresse oxidativo, por conseguinte, é um desbalanço do estado redox, na qual substâncias pró-oxidantes se sobrepõem à capacidade antioxidante, resultando em aumento da produção de ERO.

Na hipertensão arterial, o estresse oxidativo é caracterizado, principalmente, por aumento de ânions superóxidos ( $\text{O}_2^-$ ), originados a partir de NAD(P)H oxidases que catalizam a redução de 1 elétron do oxigênio usando NADH ou NAD(P)H como doadores de elétrons, além dos radicais hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), dentre outros, associado com redução das defesas antioxidantes (esquema 1) (Suzuki *et al*, 1995; Wu *et al*, 2001; Hamilton *et al*, 2001). Os ânions superóxidos ao se combinarem com o NO, formam o peroxinitrito (esquema 1), que tem alta capacidade oxidativa (Beckman *et al*, 1990; Goldstein & Czapski, 1995). Portanto, esse aumento de ERO poderia reduzir a biodisponibilidade de NO, contribuindo para a disfunção endotelial. Outros trabalhos que sustentam esse mecanismo são aqueles desenvolvidos com ratos hipertensos tratados com antioxidantes. Nesses

ratos, o tratamento com análogos da SOD, tempol e vitaminas C e E, promovem redução da pressão arterial e melhora do relaxamento endotélio dependente (Schnackenberg *et al*, 1998; Chen *et al*, 2001; Yanes *et al*, 2005; de Richelieu *et al*, 2005).

Há ainda estudos que demonstram uma redução dos “varredores” ou *scavengers* de ERO, como a SOD e a catalase, na hipertensão arterial, embora outros relatem um aumento compensatório dessas enzimas (Rathaus & Bernheim; 2002; Zhan *et al*, 2004; Wu *et al*, 2005). O aumento da expressão e atividade da NADPH oxidase e o desacoplamento da eNOS, que contribui para a formação de ânions superóxidos, também têm sido descritos na hipertensão, consequentemente, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo e disfunção endotelial (Zalba *et al*, 2000; Beswick *et al*, 2001; Wu *et al*, 2005; Fortuño *et al*, 2005).



**Esquema 1.** Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Um aumento na produção de ânions superóxidos ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), principalmente devido à ativação da NAD(P)H oxidase, está envolvido na disfunção endotelial por redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e aumento de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Adaptado de Fortuño *et al*, 2005.

As alterações na via da ciclooxigenase também estão presentes na hipertensão arterial. Artérias de resistência de ratos hipertensos (SHR) possuem menor relaxamento endotélio-dependente devido a maior liberação de fatores vasoconstritores dependentes da enzima ciclooxigenase (COX) (Diederich *et al*, 1990; Luscher *et al*, 1990). Ao mesmo tempo, a amplificação de respostas contráteis à agonistas, presentes na hipertensão, também parece envolver produtos da COX (Zerrouk *et al*, 1997; Rapoport & Williams, 1996; Alvarez *et al*, 2005). Em artéria muscular de ratos hipertensos, por exemplo, ocorre uma maior liberação de tromboxano A2 (TXA2) que, por sua vez, aumenta a vasoconstricção miogênica (Ungvari & Koller, 2000).

Respostas ao *shear stress* também estão alteradas e parte dessas modificações podem ser atribuídas aos prostanóides. Em arteríolas de músculo cremaster de ratos hipertensos, o shear stress promove vasoconstricção dependente da via da COX e PGH2, ao passo que nos ratos normotensos, resulta em vasodilatação (Huang *et al*, 2000).

Grande parte dessas alterações mencionadas acima, por outro lado, poderiam ser justificadas por modificações na expressão da enzima ciclooxigenase-1 (COX-1) ou ciclooxigenase-2 (COX-2). De fato, aortas de ratos SHR possuem maior expressão de COX-1 e maior liberação de PGH2, quando comparado aos seus controles normotensos (WKY) (Ge *et al*, 1995). Modificações na expressão da COX-2 também foram descritas em aorta de ratos hipertensos. Nesse estudo desenvolvido por Alvarez e colaboradores (2005), anéis de aorta de animais SHR apresentaram maior resposta contrátil à fenilefrina, por maior liberação de PGF2 $\alpha$  e, provavelmente, devido à maior expressão de COX-2. Finalmente, o aumento da expressão da COX-2 está envolvido no aumento do estresse oxidativo, o que poderia contribuir para a disfunção endotelial presente na hipertensão (Feng *et al*, 1995; Viridis *et al*, 2005).

Como dito anteriormente, o aumento da produção de ERO está presente na hipertensão arterial, e isso contribui para o desenvolvimento e/ou manutenção do quadro hipertensivo. Vários estudos demonstram que a angiotensina II participa desse processo porque aumenta o estresse oxidativo na hipertensão (Romero & Reckelhoff, 1999; Touyz & Schiffrin, 2001; Nickenig & Harrison, 2002).

Trabalhos demonstram que a angiotensina II, via receptores AT1, leva a produção de ERO na parede vascular em parte devido à ativação da NAD(P)H oxidase (Rajagopalan *et al*, 1996; Zhang *et al*, 1999; Touyz & Schiffrin, 2001). Somado a isso, tanto as ERO quanto a angiotensina estimulam a produção de fatores de crescimento e outros agentes pró-inflamatórios que, em conjunto, promovem disfunção endotelial. Estudos demonstram que a inibição dos receptores AT1 para angiotensina II reverte a disfunção endotelial em indivíduos hipertensos (Dohi *et al*, 2003). Além do mais, esse bloqueio diminui o estresse oxidativo em ratos SHR, além de reduzir os níveis de marcadores de inflamação plasmáticos e estresse oxidativo em pacientes hipertensos (Welch & Wilcox *et al*, 2001; Dohi *et al*, 2003). Por fim, estudos clínicos e experimentais demonstram que tanto o bloqueio da ECA quanto dos receptores AT1, não somente reduzem a pressão arterial, mas também regridem o remodelamento cardíaco e arterial, confirmando assim, o papel fundamental da angiotensina II nas alterações cardiovasculares presentes na hipertensão arterial (Ennis *et al*, 1998; Rizzoni *et al*, 1997; Yokoyama *et al*, 2005).

Além da disfunção endotelial, que pode modificar o tônus vascular e, dessa forma, contribuir para o desenvolvimento e/ou manutenção da hipertensão, alterações na atividade e/ou expressão da bomba de sódio também podem estar implicadas nesse processo (Webb & Bhor, 1979; Blaustein, 1993; Marín & Redondo, 1999).

### **1.2. A bomba de sódio e sua relação na hipertensão**

A bomba de sódio pertence a família das P-ATPases, um grupo de proteínas integrais de membrana caracterizadas pela sua função de hidrólise de ATP e pela presença de vários domínios hidrofóbicos que formam  $\alpha$ -hélices transmembrânicas (Horisberger, 2004). A  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é composta por duas grandes subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , e uma pequena subunidade  $\gamma$ .

A subunidade  $\alpha$ - catalítica, com peso molecular de aproximadamente 113kDa, possui até 10 domínios transmembrânicos e é responsável pelo transporte de cátions, hidrólise do ATP, além de atuar como receptor para glicosídeos cardíacos (Blanco & Mercer, 1998). Já foram identificados 4 isoformas desta subunidade,

sendo que a isoforma  $\alpha_1$  é amplamente distribuída pelas diferentes células do organismo, ao passo que a  $\alpha_2$  é encontrada no músculo esquelético, no cérebro, no coração, adipócitos, músculo liso vascular, bem como em vários outros tecidos; a  $\alpha_3$  é essencialmente encontrada no tecido neural, cardíaco e ovários; e por fim, a isoforma  $\alpha_4$  foi identificada somente em espermatozóides de ratos (Lingrel, 1992; Marín & Redondo, 1999).

A subunidade  $\beta$  possui um peso molecular de 55kDa apresentando um único domínio transmembrana hidrofóbico e é altamente glicosilada. Além de ser essencial para o ancoramento e estabilização do complexo protéico à membrana, essa subunidade também modula a afinidade da enzima ao  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (Blanco & Mercer, 1998). De maneira similar a subunidade  $\alpha$ , existem 4 isoformas da subunidade  $\beta$  tecido-dependente. A isoforma  $\beta_1$  é largamente distribuída no organismo, mas predominante no tecido renal; já a isoforma  $\beta_2$  é expressa no cérebro, músculo esquelético e glândula pineal; a isoforma  $\beta_3$  está presente em testículos, retina, fígado e pulmão; e finalmente, uma isoforma  $\beta_4$  relacionada a  $\text{H}^+\text{K}^+$ -ATPase, foi isolada e clonada em *Xenopus*, ratos e coelhos (Sweadner, 1989; Blanco & Mercer, 1998).

A terceira subunidade  $\gamma$ , de peso molecular de aproximadamente 14kDa, pertence a um grupo de sete proteínas recentemente descobertas, chamadas de "FXYP" (Sweadner & Rael, 2000; Geering, 2006). Esta subunidade, ou FXYP2, não produz mudanças na expressão da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, mas parece modificar as propriedades de transporte da bomba (Mercer *et al*, 1993; Geering, 2006).

Provavelmente, essa expressão tecido-dependente das isoformas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  indicam que cada uma desempenha uma função particular associada ao tecido no qual se expressa. Por exemplo, camundongos que não expressam o gene para a isoforma  $\alpha_2$  exibem aumento da força de contração muscular esquelética e cardíaca, ao passo que em camundongos que não expressam a isoforma  $\alpha_1$  têm redução da força de contração muscular (James *et al*, 1999; He *et al*, 2001). Há diferenças também em relação à sensibilidade aos glicosídeos cardíacos. Em ratos as isoformas  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$  possuem maior afinidade à ouabaína ao passo que a isoforma  $\alpha_1$  possui baixa afinidade à ouabaína, porém maior afinidade aos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (Marín & Redondo, 1999). Portanto, dependendo

do tecido na qual se expressam, funções distintas podem ser reguladas pela atividade de uma determinada isoforma.

A bomba de sódio é imprescindível para a regulação da homeostasia do sódio, potássio e cálcio, dentre outros íons, participando ativamente da regulação do tônus vascular (Webb & Bohr, 1978; Haddy, 1983; Vassalle, 1987). Diversas substâncias podem promover sua inibição ou ativação. Hormônios ou outros fatores que produzem a ativação da via da ciclooxigenase induzem a formação de PGE<sub>2</sub>, potente inibidor da bomba de sódio (Marín & Redondo, 1999). Glicosídeos cardíacos, como a ouabaína, ou solução livre de K<sup>+</sup>, também produzem inibição da bomba de sódio e, conseqüentemente, aumento do tônus vascular (Toda, 1980; Marín *et al*, 1988; Sato & Aoki, 1988).

A inibição da bomba, em nível de musculatura lisa vascular, acarreta aumento de resistência vascular. Dentre os mecanismos envolvidos nesse aumento da resistência incluem a despolarização, que termina por ativar canais para cálcio dependentes de voltagem e influxo de cálcio e redução da atividade do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (Ozaki *et al*, 1978; Fleming, 1980; Casteels *et al*, 1985; Vassalle, 1987; Marín *et al*, 1991; Blaustein, 1993). Além disso, o aumento de cálcio intracelular ocasionado pela inibição da bomba de sódio, pode promover maior liberação de norepinefrina das terminações nervosas perivasculares resultando em aumento da resistência vascular (Karaki & Urakawa, 1977; Rodríguez-Mañas *et al*, 1994).

Outras substâncias derivadas do endotélio também podem interferir no funcionamento da bomba de sódio, ativando-a, como é o caso da angiotensina II, endotelina-1 e prostaciclina (Marín & Redondo, 1999). O óxido nítrico também é um estimulante da atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, sendo que este efeito constitui-se num dos seus mecanismos de ação vasorelaxante (Gupta *et al*, 1994; Gupta *et al*, 1996).

Levando-se em conta que a atividade da bomba de sódio está relacionada à manutenção da homeostasia do sódio e a regulação do tônus vascular, alterações na atividade e/ou expressão desta enzima podem modificar de forma expressiva a resistência vascular e assim, estar envolvidas na hipertensão arterial.

De fato, alguns estudos demonstram que em alguns modelos de hipertensão a atividade e/ou expressão da bomba de sódio está alterada (Webb & Bohr, 1979; David-Dufilho *et al*, 1984; Hopp *et al*, 1986; Rossoni *et al*, 2002a). Muitos desses estudos sugeriram, então, a possibilidade de que haveria, no plasma de animais

hipertensos, um fator circulante capaz de inibir a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, uma vez que a subunidade  $\alpha$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase possui um sítio de ligação para glicosídeos cardíacos.

### 1.3. Ouabaína endógena

A ouabaína, um glicosídeo cardiotônico, foi reconhecido como um composto ativo primário do veneno de flexas da tribo Maasai, na África, há mais de cem anos atrás por um antropologista francês chamado Arnaud. É originária da semente de plantas africanas como a *Strophantus gratus* (ou Ouabaio) e *Acokanthera schimpert*. Assim como a *Digitalis purpurea*, a ação da ouabaína ocorre através de sua capacidade de inibir a bomba de sódio. Nos seres humanos, a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase possui em sua subunidade  $\alpha$  um sítio de ligação para digitálicos. No entanto, a função exata desse “receptor” para ouabaína ainda não foi totalmente esclarecida e é objetivo de muitos estudos que se iniciaram no início da década de 60.

A primeira pesquisa que sugeriu a existência de uma substância de origem endógena inibidora da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase foi desenvolvida por de Wardener e colaboradores (1961). Nesse estudo, cães foram submetidos a uma sobrecarga salina e o sangue desses cães foi doado para outro animal receptor. Os cães receptores, então, apresentaram aumento da natriurese, sugerindo, portanto, que aqueles animais submetidos à expansão aguda de volume liberavam um hormônio natriurético circulante que participava da excreção de sódio pelos rins.

Após esse estudo, vários pesquisadores sugeriram que o hormônio natriurético circulante liberado em resposta às expansões de volume extracelular, poderia ser um inibidor da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Kramer *et al*, 1969; Buckalew *et al*, 1970; Pamnani *et al*, 1981). Mais tarde, outros estudos verificaram que esse mesmo hormônio participava da gênese de hipertensões dependentes de volume, já que nesses casos, a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase encontrava-se reduzida (Overbeck *et al*, 1976; Haddy & Overbeck, 1976; Clough *et al*, 1983; Songu-Mize *et al*, 1987).

No entanto, a confirmação do envolvimento desse hormônio na hipertensão arterial foi realizada nos estudos que correlacionaram positivamente os níveis plasmáticos dessa substância com os níveis pressóricos de indivíduos normotensos

e hipertensos (Pamnani *et al*, 1981; Hamlyn *et al*, 1982). Os níveis plasmáticos desse inibidor são aumentados pela ingestão de sódio em pacientes com hipertensão essencial, e esse nível também se correlaciona positivamente com a pressão arterial (de Wardener *et al*, 1981; Hasegawa *et al*, 1987).

Entretanto, a natureza química dessa substância ainda permanecia desconhecida. O termo *digitalis-like* apareceu na literatura quando Gruber e colaboradores (1980) mostraram que esse inibidor plasmático da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase fazia reação cruzada com anticorpos anti-digoxina. Porém, somente mais tarde, é que a estrutura química do fator endógeno circulante inibidor da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase foi estabelecida. Assim, em 1991, diversos pesquisadores demonstraram que o composto endógeno tinha uma composição química similar à ouabaína (C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>O<sub>12</sub>), bem como a atividade bioquímica e fisiológica semelhantes, além de possuir 100% de reatividade cruzada com anticorpos policlonais para ouabaína (Hamlyn *et al*, 1991; Mathews *et al*, 1991; Ludens *et al*, 1991; Bova *et al*, 1991). A partir de então, o composto passava a se chamar *ouabain-like* ou ouabaína endógena.

Em relação à origem endógena da substância *ouabain-like*, alguns estudos que identificaram alguns sítios de produção e liberação foram desenvolvidos antes mesmo da caracterização desse hormônio. Pelo menos três importantes origens foram identificadas: o hipotálamo, a região anteroventral do terceiro ventrículo e a zona glomerulosa do córtex adrenal (Hauptert & Sancho, 1979; Pamnani *et al*, 1981; Songu-Mize *et al*, 1982; Bealer *et al*, 1983; de Wardener & Clarkson, 1985; Morgan *et al*, 1985; Tamura *et al*, 1987; Ludens *et al*, 1992). Hoje, sabe-se também, que a ouabaína endógena pode ser liberada por miócitos ventriculares (D'Urso *et al*, 2004).

A ouabaína endógena pode ser secretada em resposta a diversos estímulos. Sem dúvida, o principal deles é o aumento da concentração plasmática de sódio seguido por expansão aguda de volume (de Wardener *et al*, 1961; Blaustein, 1993; Yamada *et al*, 1997). No entanto, a secreção de ouabaína também ocorre em resposta à estimulação β-adrenérgica, bem como pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e angiotensina II, via receptores AT2 (Laredo *et al*, 1994; Laredo *et al*, 1995; Laredo *et al*, 1997; Shah *et al*, 1999; Bauer *et al*, 2005).

O aumento dos níveis plasmáticos de ouabaína tem sido associado a diversos estados patológicos como hipertensão essencial, insuficiência cardíaca congestiva,

hiperaldosteronismo primário, insuficiência renal crônica, pré-eclampsia, síndrome de Cushing, dentre outras (Hamlyn *et al*, 1982; Gottlieb *et al*, 1992; Naruse *et al*, 1994; Rossi *et al*, 1995; Hamlyn *et al*, 1996). Em indivíduos hipertensos, os níveis plasmáticos de ouabaína podem variar entre 0,08 à 25 nmol/l, enquanto que em normotensos ocorre uma variação entre 0,07 à 0,77 nmol/l (Rossi *et al*, 1995).

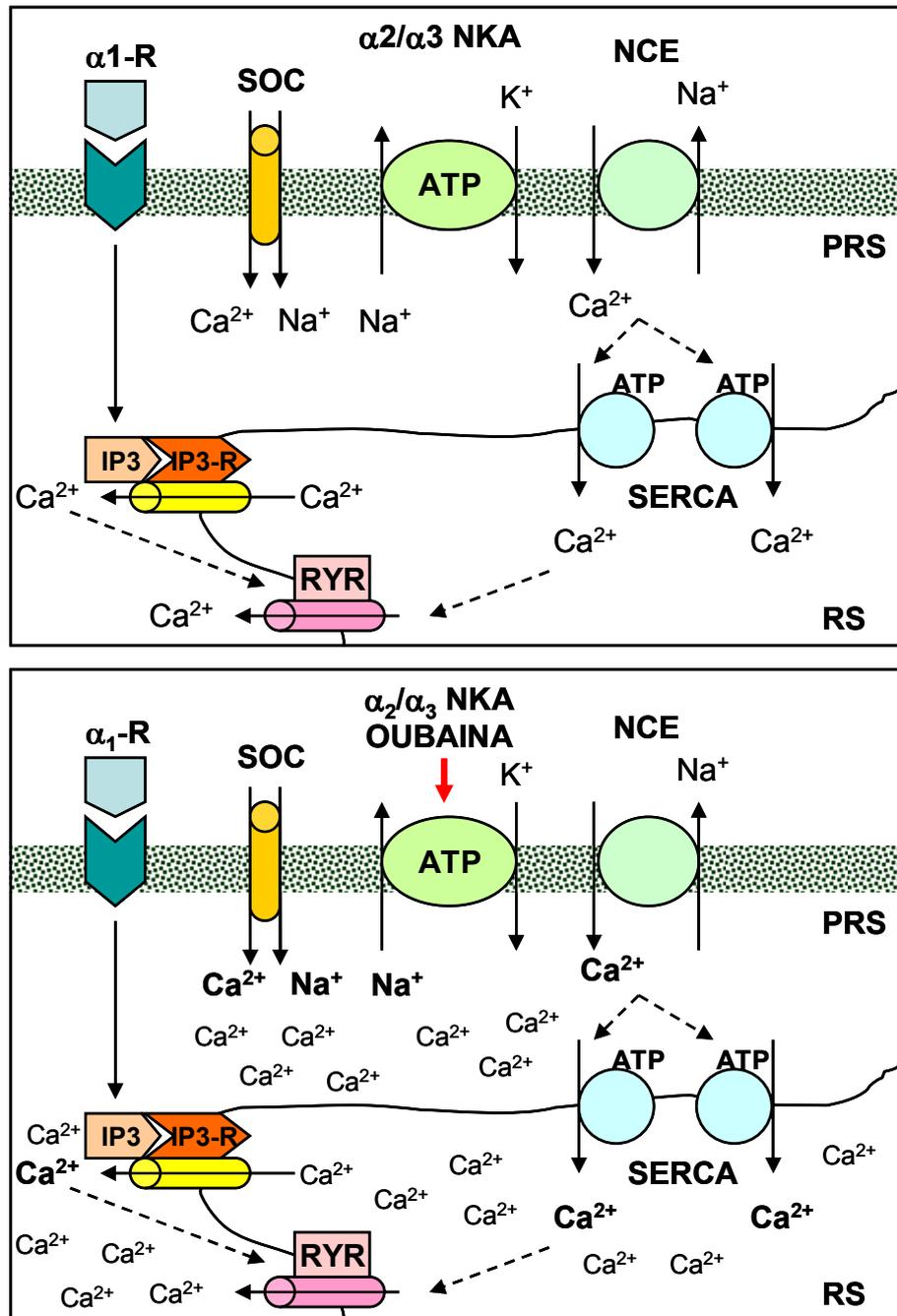
A ouabaína endógena poderia estar envolvida na gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial pelo fato de poder se ligar a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, inibindo-a. De acordo com o mecanismo de ação dos digitálicos, essa substância ao se fixar na subunidade  $\alpha$ , promoveria inibição do transporte de íons e, conseqüentemente, acúmulo de sódio intracelular. O aumento da  $[\text{Na}^+]$  citosólico, por sua vez, reduz ou inibe a atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , aumentando as concentrações de cálcio intracelular (Blaustein, 1988; Marín *et al*, 1988). Com isso a membrana é despolarizada aumentando a probabilidade de abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem, com posterior influxo de cálcio para dentro da célula (Vassalle, 1987; Marin *et al*, 1988). Com o aumento das concentrações intracelulares de cálcio há maior recaptção desse íon para o retículo sarcoplasmático, aumentando seus estoques intracelulares (Fleming, 1980; Mulvany, 1992; Blaustein, 1993). Dessa forma, isso resultaria em amplificação das respostas contráteis a agentes vasoativos pela ouabaína. Por fim, a inibição da bomba de sódio nas terminações perivasculares simpáticas, poderia promover a liberação de noradrenalina e redução da recaptção da mesma, induzindo, assim, contração do músculo liso vascular (Vanhoutte & Lorenz, 1984; Marin *et al*, 1988). Essas ações em conjunto, aumentam a resistência vascular periférica e produzem efeito inotrópico positivo, conseqüentemente, elevando a pressão arterial.

Todas essas ações foram baseadas em pesquisas experimentais com doses terapêuticas de ouabaína. Assim, um desses estudos verificou que em artérias cerebrais de rato a ouabaína poderia agir diretamente no músculo liso vascular, ao passo que em artérias femorais promovia liberação de noradrenalina pelas terminações perivasculares, em ambas as situações resultando em contração das artérias (Marin *et al*, 1988). No entanto, alguns trabalhos demonstraram que algumas ações da ouabaína poderiam ser negativamente moduladas pelo endotélio, através da liberação de um fator vasodilatador (Sánchez-Ferrer *et al*, 1992; Rodríguez-Mañas *et al*, 1992; Rodríguez-Mañas *et al*, 1994). A modulação do

endotélio nas respostas da ouabaína, no entanto, poderiam variar quando se tratasse de um animal hipertenso. Ponte e colaboradores (1996a; b) demonstraram que em aorta de ratos normotensos (WKY), as contrações da ouabaína eram moduladas negativamente pelo endotélio, ao passo que em ratos hipertensos (SHR), o endotélio liberava um fator vasoconstrictor. Entretanto, a natureza química desses fatores endoteliais ainda não era conhecida. Alguns estudos realizados em cultura de células endoteliais verificaram que a ouabaína poderia promover a liberação de prostaciclina, endotelina e NO (Nakagawa *et al*, 1987; Yamada *et al*, 1990; Xie *et al*, 1993).

No entanto, esses mecanismos acima são descritos somente para concentrações de ouabaína na ordem de  $\mu\text{M}$ , ou seja, concentrações farmacológicas. Já os mecanismos de ação da ouabaína em concentrações nanomolares, próximas às fisiológicas ou patológicas, são distintas das citadas acima.

A ouabaína endógena, em concentrações nanomolares, parece atuar num microdomínio celular denominado de *plasmersome* (Blaustein *et al*, 1998). Neste microdomínio, a isoforma  $\alpha_1$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase estaria distribuída uniformemente pelas células atuando como uma varredora de sódio intracelular, sendo responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico do sódio e do potássio. Esta isoforma possui alta afinidade ao sódio e baixíssima afinidade a ouabaína. Já as isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , que possuem alta afinidade à ouabaína e baixa afinidade ao sódio, estariam co-localizadas com o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  e próximas do retículo sarcoplasmático juncional numa microrregião da célula denominada de *plasmersome* (Juhászova *et al*, 1996; Golovia & Blaustein, 1997; Blaustein *et al*, 1998). Assim, mesmo concentrações nanomolares de ouabaína poderiam inibir a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, ocasionando um aumento das concentrações de sódio na região do *plasmersome*, que por sua vez, inibiria a troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , com conseqüente aumento das concentrações de cálcio, também somente nessa microrregião, o que levaria ao acúmulo de cálcio no retículo sarcoplasmático (esquema 2). De fato, a inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase por concentrações nanomolares de ouabaína não elevam o cálcio citosólico (Arnon *et al*, 2000). Esse poderia ser um mecanismo adicional que poderia explicar como concentrações nanomolares de ouabaína poderiam contribuir para o processo hipertensivo.



**Esquema 2.** Modelo do plasmosfera (PRS) e o mecanismo envolvido no aumento de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) transiente induzido por baixas doses de ouabaína em células musculares lisas (CML). O esquema mostra o retículo sarcoplasmático (RS) juncional com suas  $Ca^{2+}$ -ATPases na membrana (SERCA), o microdomínio entre a membrana do RS e a membrana plasmática adjacente com os canais de cálcio operados por estoques (SOC), as isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  da  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase (NKA) e o trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCE). Painel superior: Sob condições normais. Painel inferior: Após administração de baixas doses de ouabaína.  $\alpha_1$ -R; receptor alfa-adrenérgico; IP<sub>3</sub>, trifosfato de inositol; IP<sub>3</sub>-R, receptor de IP<sub>3</sub>; RYR, receptor de rianodina. Modificado de Arnon *et al* (2000).

Diversos pesquisadores, utilizando concentrações nanomolares de ouabaína verificaram que essa substância, agudamente, além de aumentar a pressão arterial de ratos hipertensos, potencializa as respostas vasoconstritoras a agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (Songu-Mize *et al*, 1995; Vassallo *et al*, 1997; Rossoni *et al*, 2001, Padilha *et al*, 2004). Trabalho desenvolvido por Rossoni e colaboradores (1999) mostrou que em artéria caudal de ratos normotensos, 10 nM de ouabaína, além de promover aumento de reatividade vascular à fenilefrina, estimula a liberação de um fator endotelial que é capaz de modular negativamente o endotélio. Por outro lado, Padilha e colaboradores (2004), estudando a reatividade vascular na artéria caudal de ratos hipertensos, demonstraram que o aumento da responsividade à fenilefrina após incubação com ouabaína, era atribuído à estimulação da ECA e liberação de angiotensina II local. Esses dados sugerem que os efeitos de baixas concentrações de ouabaína são distintos em presença de hipertensão arterial, e poderiam colaborar para a gênese e/ou manutenção da mesma. Ao mesmo tempo, o modelo de hipertensão estudado parece, também, influenciar nas ações da ouabaína.

Em ratos tratados cronicamente com L-NAME, a administração aguda de 10nM de ouabaína foi capaz de elevar a pressão arterial nesses animais, porém esse efeito não foi atribuído a uma ação vascular direta isolada desse digitálico, mas sugere alterações centrais no tônus simpático (Rossoni *et al*, 2003). Além do mais, nesse mesmo estudo, a reatividade vascular à fenilefrina foi reduzida após a administração aguda de ouabaína, sugerindo a liberação de um fator vasodilatador dependente do endotélio. Por outro lado, em ratos hipertensos DOCA-sal, a mesma concentração de ouabaína aumenta a reatividade vascular à fenilefrina no leito vascular caudal desses animais (Rossoni *et al*, 2001). Já em SHR, um modelo animal que mimetiza a hipertensão essencial humana, como mencionado anteriormente, 1nM de ouabaína eleva a pressão arterial e a reatividade vascular à fenilefrina por um mecanismo periférico dependente da liberação de angiotensina (Padilha *et al*, 2004). Portanto, parece que os efeitos da ouabaína sobre a reatividade vascular dependem, em parte, do modelo de hipertensão estudado e das concentrações de ouabaína utilizadas.

Além das ações periféricas da ouabaína, ações centrais também já foram descritas. Diversos trabalhos, utilizando concentrações nanomolares de ouabaína, verificaram que a administração subcutânea ou intracerebroventricular crônica de ouabaína em ratos Wistar induz aumento da pressão arterial via aumento da

atividade simpatoexcitatória e redução da simpatoinibitória, já que o bloqueio ganglionar com hexametônio normaliza a pressão arterial (Leenen *et al*, 1994; Huang & Leenen, 1994). Esse mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que ratos SHR e Dahl-sensíveis submetidos a dieta rica em sódio, liberam ouabaína, de origem “central”, responsável pelo aumento da via simpatoexcitatória e redução da simpatoinibitória, ocasionando exacerbação da hipertensão nesses animais (Huang & Leenen, 1996a). Esses efeitos centrais da ouabaína parecem envolver a ativação do sistema renina-angiotensina, já suas ações pressoras são inibidas por administração de losartan, um bloqueador de receptores AT<sub>1</sub> para angiotensina II (Huang & Leenen, 1996b; Huang *et al*, 1998).

Portanto, os efeitos periféricos da ouabaína sobre o músculo liso vascular modificando a resistência vascular periférica, associados aos seus efeitos simpatoexcitatórios centrais, podem contribuir para a gênese e/ou manutenção dos processos hipertensivos.

### **1.3.1. Hipertensão induzida pelo tratamento crônico com ouabaína**

A ouabaína, quando administrada cronicamente, é capaz de induzir hipertensão. Yuan e colaboradores (1993) foram os primeiros pesquisadores a demonstrar este fato. Logo em seguida, Manunta e colaboradores (1994), verificaram que a hipertensão provocada por administração crônica de ouabaína era dose-dependente.

Essa hipertensão induzida pela ouabaína parece depender de um componente central, já que a administração de hexametônio abole o aumento dos níveis pressóricos em ratos tratados com ouabaína, tanto por via periférica (subcutaneamente) como central (intracerebroventricularmente) (Huang *et al*, 1994). Ao mesmo tempo, esse mesmo grupo de pesquisadores, verificou que o desenvolvimento dessa hipertensão é acompanhado de um aumento da atividade simpática e um prejuízo do baroreflexo (Huang & Leenen, 1999). Esse efeito hipertensinogênico envolve a ativação do sistema renina-angiotensina central uma vez que a hipertensão induzida pela ouabaína pode ser prevenida em presença de losartan ou embusartan (Zhang & Leenen, 2001). Além disso, promove também aumento do conteúdo de angiotensina II no hipotálamo (Cheung *et al*, 2006).

Além dos efeitos hipertensinogênicos da ouabaína envolverem a ativação do sistema renina-angiotensina, pesquisas recentes também demonstram a participação da via da endotelina 1. Nessas pesquisas, o tratamento crônico com ouabaína aumenta a liberação de endotelina 1 pela área cinzenta periaquedutal que, via receptores ETa, nessa mesma área, promovem aumento da resistência vascular renal e redução do fluxo sanguíneo, indicando hiperreatividade simpática (Di Filippo *et al*, 2003; D'Amico *et al*, 2003).

No entanto, a hipertensão induzida pela ouabaína também promove alterações periféricas de grande relevância. Rossoni e colaboradores (2002a; b) verificaram que, periféricamente, a administração crônica de ouabaína em ratos promove alterações regionais na reatividade vascular à fenilefrina. Esses pesquisadores verificaram uma redução na resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta torácica e mesentérica superior sem promover, no entanto, alterações em anéis de artéria caudal. Outros dados corroboram as mudanças regionais de reatividade vascular induzida pela ouabaína crônica. Em anéis de artéria renal de ratos tratados, tanto a resposta constritora ao cloreto de potássio quanto à resposta à fenilefrina foram aumentadas em relação aos respectivos controles (Kimura *et al*, 2000). Já em segmentos de artéria mesentérica de resistência, o tratamento com ouabaína não promove modificações na reatividade vascular à noradrenalina (Xavier *et al*, 2004b).

Assim como os estudos desenvolvidos com administração aguda de ouabaína, o tratamento crônico também altera a expressão e a liberação de fatores endoteliais e esse mecanismo também varia de acordo com a artéria estudada. No trabalho desenvolvido por Rossoni e colaboradores (2002b), citado acima, a redução na reatividade vascular à fenilefrina em aorta e mesentérica superior de animais tratados com ouabaína, parece depender da liberação de NO. Ao mesmo tempo, essas artérias apresentaram aumento da expressão protéica para a eNOS e nNOS. Corroborando esses dados, Xavier e colaboradores (2004b) também verificaram que a redução da resposta à fenilefrina em artéria mesentérica superior dependia da liberação de NO e redução dos prostanóides pelo endotélio. No entanto, em segmentos de artéria mesentérica de resistência de ratos tratados, o aumento da modulação via NO e redução do EDHF, justificava a ausência de alterações na reatividade à noradrenalina nessas artérias (Xavier *et al*, 2004b). A liberação de NO

pelas terminações nitrérgicas de artérias mesentéricas superiores também parece estar aumentada em resposta à estímulos elétricos, após tratamento crônico com ouabaína (Xavier *et al*, 2004a). Essa maior liberação de óxido nítrico neuronal, parece dever-se ao aumento da expressão da nNOS (Xavier *et al*, 2004a).

No entanto, além da via do NO, outros sistemas endoteliais estão envolvidos nas ações da ouabaína crônica. Xavier e colaboradores (2004c), verificaram que a redução na reatividade vascular à fenilefrina em aorta de ratos tratados cronicamente com ouabaína eram dependentes de endotelina 1, via receptores ETA, uma vez que o bloqueio desses receptores abolia a modulação endotelial negativa.

Todos esses dados sustentam a hipótese de que as alterações vasculares periféricas induzidas pelo tratamento crônico com ouabaína constituem-se, não um mecanismo que poderia contribuir para um efeito hipertensinogênico dessa substância, mas sim, mecanismos compensatórios a essa hipertensão. No entanto, esses estudos foram desenvolvidos em estágios tardios da hipertensão ouabaína e muitos deles, utilizando artérias de condutância.

Uma das propostas desse estudo foi determinar, em artérias mesentéricas de resistência, se em estágios mais recentes dessa hipertensão, a ouabaína é capaz de produzir alterações na reatividade vascular que poderiam ser favoráveis ou então, se contrapõem à manutenção da hipertensão. Portanto, poderíamos realizar um estudo comparativo das ações temporais da ouabaína, através da análise de suas ações em estágios precoces da hipertensão desenvolvida pelo tratamento com esse digitálico, e ao mesmo tempo, comparar essas respostas com as obtidas de estudos anteriores, desenvolvidos em estágios mais tardios dessa hipertensão.

Como já mencionado, trabalhos prévios do nosso grupo (Padilha *et al*, 2004) verificaram que a administração aguda de concentrações nanomolares de ouabaína, próximas àquelas encontradas no plasma de indivíduos normotensos, aumentam a reatividade vascular à fenilefrina em ratos SHR, mas não em ratos normotensos. Esse aumento é dependente da estimulação da ECA e da liberação local de angiotensina II. No entanto, estudos que utilizaram concentrações de ouabaína na ordem de 10nM verificaram que ratos normotensos, além exibirem um aumento da reatividade vascular à fenilefrina, liberam um fator endotelial que é capaz de modular negativamente o endotélio, possivelmente um fator que estimula a abertura de canais de potássio (Rossoni *et al*, 1999). Já em ratos hipertensos L-NAME,

diferentemente de ratos DOCA-sal, essa mesma concentração de ouabaína produz redução da reatividade vascular à fenilefrina, sugerindo a liberação de um fator vasodilatador em resposta a ouabaína (Rossoni *et al*, 2001, 2003). Portanto, parece que os efeitos agudos da ouabaína sobre a reatividade vascular dependem, em parte, do modelo de hipertensão em estudo e da concentração do digitálico utilizada.

A maior parte dos casos de hipertensão arterial desenvolvida na população são do tipo essencial, ou seja, não apresentam uma causa específica. Ao contrário, são decorrentes de processos multifatoriais que incluem aumento da resistência vascular periférica, da atividade simpática, do sistema renina-angiotensina além de possuir um forte componente genético e poder ser influenciada por fatores ambientais, como tabagismo e obesidade (Folkow *et al*, 1982; Wyss, 1993; Kaplan, 1998). Um modelo de hipertensão animal que possui muita dessas características são os ratos SHR, pois assim como a hipertensão essencial humana, este modelo é uma expressão de doença hipertensora determinada geneticamente, de origem poligênica e influenciada por fatores ambientais (Okamoto & Aoki, 1963). Além do mais, como já exposto, esses animais parecem ser mais sensíveis às ações da ouabaína.

Trabalhos anteriores do nosso grupo já demonstram que esses animais exibem um aumento de reatividade vascular à fenilefrina com concentrações de ouabaína na ordem de 1nM, 10nM e 100µM (Vassallo *et al*, 1997; Padilha *et al*, 2004). No entanto, os mecanismos envolvidos nesse aumento de reatividade com as concentrações de ouabaína acima de 10nM ainda não foram esclarecidos. Uma vez que já está estabelecido o envolvimento do sistema renina-angiotensina em resposta à 1nM de ouabaína, permaneceu uma dúvida: Esse mecanismo de ação se manteria em concentrações mais elevadas desse digitálico? Uma outra questão relevante é que a reatividade vascular de ratos normotensos não é modificada por baixas concentrações de ouabaína. No entanto, elevando-se a concentração para 10nM, esses animais exibem aumento de reatividade vascular, ao mesmo tempo em que liberam um fator endotelial capaz de modular negativamente a resposta à fenilefrina (Rossoni *et al*, 1999). Portanto, esses mecanismos também estariam mantidos se elevássemos a concentração de ouabaína?

Dessa forma, uma outra proposta desse estudo foi verificar se concentrações mais elevadas de ouabaína, como por exemplo 1 $\mu$ M, conhecida por aumentar a reatividade vascular tanto de ratos hipertensos como de normotensos, poderiam promover alterações vasculares similares àquelas encontradas com concentrações nanomolares.

## **OBJETIVOS**

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Estudar, de forma aguda, os efeitos da administração de 18µg/Kg (*i.v.*) e 1µM de ouabaína na pressão arterial e reatividade vascular à fenilefrina no leito vascular caudal, respectivamente, de ratos normotensos e hipertensos. Ao mesmo tempo, avaliar o possível envolvimento da angiotensina II nessas respostas, uma vez que já está estabelecido o seu envolvimento nos efeitos de concentrações nanomolares de ouabaína.

Também objetivamos analisar as possíveis alterações na reatividade vascular à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos tratados por 15 dias com ouabaína e a participação dos diferentes fatores endoteliais nesta resposta.

### 2.2. Objetivos específicos

#### ***Estudos dos efeitos agudos da ouabaína***

- Avaliar os efeitos da administração aguda de 18µg/Kg de ouabaína (~30 nmol/Kg) na pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca de ratos normotensos (Wistar e WKY) e hipertensos (SHR).
- Verificar a participação da angiotensina II nos efeitos pressores produzidos pela ouabaína sobre a pressão arterial sistólica e diastólica, bem como da frequência cardíaca em ratos normotensos e hipertensos.
  
- Avaliar o efeito de 1µM de ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina, no leito vascular caudal de ratos normotensos (Wistar e WKY) e hipertensos (SHR).
- Estudar uma possível modulação endotelial sobre os efeitos da ouabaína no leito vascular caudal desses animais.
- Investigar a possível participação da angiotensina II nos efeitos da ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina, no leito vascular caudal de ratos Wistar, WKY e SHR.

***Estudo dos efeitos crônicos da ouabaína***

- Avaliar a pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca em ratos tratados por 15 dias com ouabaína.
- Verificar se o tratamento com ouabaína altera a reatividade vascular à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência.
- Estudar uma possível modulação endotelial sobre os efeitos crônicos da ouabaína nestas artérias, bem como estudar que possíveis fatores endoteliais poderiam estar envolvidos.
- Avaliar se o tratamento crônico com a ouabaína altera, em artérias mesentéricas de resistência, a expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico e da ciclooxigenase-2.
- Investigar se o tratamento crônico com a ouabaína altera a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  sensível à ouabaína nas artérias mesentéricas de resistência.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Experimentos agudos

##### 3.1.1. Animais Experimentais

Neste estudo, foram utilizados ratos normotensos Wistar e Wistar Kyoto (WKY), e ratos espontaneamente hipertensos (SHR); machos, com idade aproximada de 12 semanas. Esses animais foram cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob condições controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso a água e alimentação.

##### 3.1.2. Experimentos agudos “*in vivo*”

###### 3.1.2.1. Metodologia para as preparações “*in vivo*”

Ratos Wistar, WKY e SHR foram anestesiados com uretana (1,2 g/ Kg, *i.p.*) e submetidos à canulação da artéria carótida e veia jugular, para medida de pressão arterial e administração de drogas, respectivamente. As canulações foram realizadas com um cateter de polietileno (PE-50, Clay-Adams) preenchido com salina heparinizada (100 U/ml). A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (modelo 1050BP) que por sua vez estava conectado a um pré-amplificador, e este, por sua vez, conectado a um sistema Biopac de aquisição de dados (MP100 Biopac Systems, Inc; CA). Foram feitos registros contínuos da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC).

###### 3.1.2.2. Protocolos experimentais para as preparações “*in vivo*”

- **Avaliação da pressão arterial antes e após administração de ouabaína**

Estudos prévios do nosso laboratório (Vassallo *et al*, 1997; Padilha *et al*, 2004) sugerem que o tratamento com 0,18 µg/Kg de ouabaína leva a concentrações plasmáticas nanomolares (0,3 nmol/Kg) deste digitálico, caso se assuma que este fármaco foi diluído em 40 ml de volume extracelular por cada 100 gramas de rato.

Seguindo o mesmo raciocínio, utilizamos a dose de 18 µg/Kg, para alcançarmos, dessa forma, uma concentração plasmática aproximada de 30 nmol de ouabaína.

Após 30 minutos de estabilização, foi feito o registro controle de pressão arterial sistólica e diastólica e, em seguida, ouabaína (18 µg/Kg, *i.v.*) foi administrada. Uma hora depois, os valores de pressão arterial foram novamente registrados.

Foram analisadas as mudanças de pressão arterial sistólica e diastólica, bem como de frequência cardíaca, antes e após uma hora da administração de ouabaína, comparando possíveis alterações sobre estas variáveis, entre os animais normotensos e hipertensos.

- ***Efeito do bloqueio dos receptores AT1 para angiotensina II sobre a resposta pressora induzida pela ouabaína***

Com a finalidade de avaliar uma possível participação do sistema renina-angiotensina nas ações da ouabaína, foi utilizado Losartan (10 mg/kg, *i.v.*), um bloqueador dos receptores AT1 para angiotensina II. Após 30 minutos de estabilização, foi feito o registro controle de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca e, em seguida, foi administrado losartan. Após 30 minutos da administração deste fármaco, foram realizados, novamente, registros de pressão arterial e frequência cardíaca, e em seguida, ouabaína (18 µg/Kg, *i.v.*) foi administrada. Após 1 hora, os valores de pressão arterial e frequência cardíaca foram novamente avaliados.

### ***3.1.3. Experimentos agudos “in vitro”***

#### ***3.1.3.1. Avaliação dos valores pressóricos***

Um dia antes da realização dos experimentos “*in vitro*”, os ratos SHR, WKY e Wistar foram anestesiados com éter etílico e submetidos à cateterização da artéria carótida direita com cateter de polietileno (PE 50, Clay-Adams), o qual foi exteriorizado para o dorso do animal, subcutaneamente. Os ratos foram colocados em gaiolas individuais e, no dia seguinte, a cânula foi conectada a um transdutor de pressão (modelo 1050BP) conectado a um pré-amplificador o qual estava conectado a um sistema Biopac de aquisição de dados (MP100 Biopac Systems, Inc; CA).

Foram feitos registros contínuos da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) durante 30 minutos.

### **3.1.3.2. Metodologia empregada para estudos de reatividade vascular no leito vascular caudal de rato**

Para a realização dos estudos *in vitro* foi utilizada a técnica de perfusão do leito vascular caudal, descrita por França e colaboradores (1997). Após a realização dos registros de pressão arterial e frequência cardíaca, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (65 mg/Kg, *ip*) e heparinizados (500 UI, *ip*). A seguir, a artéria caudal foi dissecada e canulada próximo à sua base com um intracate (Safelet intracate 24G X  $\frac{3}{4}$ , NIPRO) preenchido por solução nutritiva. A cauda foi seccionada, isolada e conectada a um sistema de perfusão (Anexo 1). As artérias caudais foram perfundidas com solução de Krebs-Henseleit, composta por (em mM): NaHCO<sub>3</sub> 27,2; NaCl 119; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1; MgSO<sub>4</sub> 1,2; KCl 5,0; CaCl<sub>2</sub> 1,25; glicose 11; EDTA 0,03. Esta solução foi mantida à temperatura de 36°C ± 0,5°C, aerada pelo borbulhamento de mistura carbogênica contendo 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, mantendo o pH estável em 7,4. A perfusão do leito vascular caudal foi mantida sob fluxo constante de 2,5 ml/min por meio de uma bomba peristáltica (Milan, Colombo, Paraná, Brasil) e o sistema de perfusão foi conectado a um transdutor de pressão Nihon-Kohden TP-200T (conectado a um pré-amplificador FUNBEC MP-100) que por sua vez estava conectado a um sistema de aquisição de dados (MP100 Biopac System, Inc; CA), o qual era ligado a um computador (PC Pentium), para registros contínuos de pressão de perfusão neste leito vascular. Após a montagem, a preparação foi submetida a um período de estabilização de 45 minutos e, em seguida, foram iniciados os protocolos experimentais. Baseando-se na relação: Pressão = Fluxo x Resistência, e sendo o fluxo constante, as variações de pressão refletiam variações na resistência vascular.

### **3.1.3.3. Protocolos experimentais para as preparações “in vitro”**

- **Efeito da ouabaína 1 µM sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito vascular caudal**

Para a realização deste protocolo, após o período de estabilização, doses crescentes de fenilefrina (0,01 - 100 µg, *in bolus*, em um volume de 100µl), foram

administradas antes e após uma hora de infusão contínua com ouabaína (1  $\mu\text{M}$ ), em presença do endotélio vascular.

Ao final desses experimentos, a integridade funcional do endotélio foi avaliada. Para isso, o leito vascular caudal foi previamente contraído através da infusão contínua de fenilefrina ( $10^{-7}\text{M}$ ) e após o estabelecimento de um platô,  $5\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  de acetilcolina (*in bolus*) foi administrada.

- **Modulação do endotélio no efeito da ouabaína 1  $\mu\text{M}$  sobre a resposta pressora à fenilefrina**

Com a finalidade de avaliar uma possível modulação do endotélio no efeito da ouabaína (1  $\mu\text{M}$ ) sobre a resposta pressora à fenilefrina, em animais normotensos e hipertensos, foi realizada a lesão química do endotélio. Ao mesmo tempo, também foi avaliada a modulação endotelial sobre a resposta pressora a esse agonista  $\alpha$ -adrenérgico nos animais normotensos e hipertensos.

A lesão do endotélio foi feita através da administração de CHAPS, {3-[(3-cloroamidopropil) dimetilamônio]-l-propanosulfonato} (8mg, *in bolus*, em volume de 80  $\mu\text{l}$ ). Após o restabelecimento da situação basal, as preparações foram submetidas a doses crescentes de fenilefrina (0,01 - 100  $\mu\text{g}$ , *in bolus*, em um volume de 100 $\mu\text{l}$ ) antes e após infusão contínua, por uma hora, de ouabaína (1  $\mu\text{M}$ ).

A lesão endotelial foi confirmada pela ausência de relaxamento a acetilcolina ( $5\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ) em preparações pré-contraídas com fenilefrina ( $10^{-7}\text{M}$ ). A administração de dose única de nitroprussiato de sódio ( $5\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ), um agente vasodilatador independente do endotélio, também foi realizada para avaliar a integridade do relaxamento do músculo liso vascular induzido pelo óxido nítrico.

- **Envolvimento da angiotensina II sobre o efeito da ouabaína 1  $\mu\text{M}$  na resposta pressora à fenilefrina**

A participação do sistema renina-angiotensina nas curvas concentração-resposta à fenilefrina e no efeito produzido pela ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina foi avaliado através da infusão de losartan ( $10^{-4}\text{M}$ ), um inibidor de receptores  $\text{AT}_1$  para angiotensina II. Assim, curvas dose-resposta à fenilefrina (0,01 - 100  $\mu\text{g}$ , *in bolus*, em um volume de 100 $\mu\text{l}$ ) foram desenvolvidas antes e após a co-infusão desse fármaco e/ou ouabaína.

## **3.2. Experimentos crônicos**

### **3.2.1. Animais experimentais**

Nesse estudo foram utilizados ratos Wistar, machos, normotensos, com 45 dias de vida. Esses animais foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina da *Universidad Autónoma de Madrid*. Durante o tratamento, os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à ração e água, sob um ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente.

Os ratos foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais: (1) animais tratados com ouabaína durante 15 dias (25 µg/Kg/dia s.c. dissolvida em óleo de soja) e (2) animais controle tratados somente com veículo.

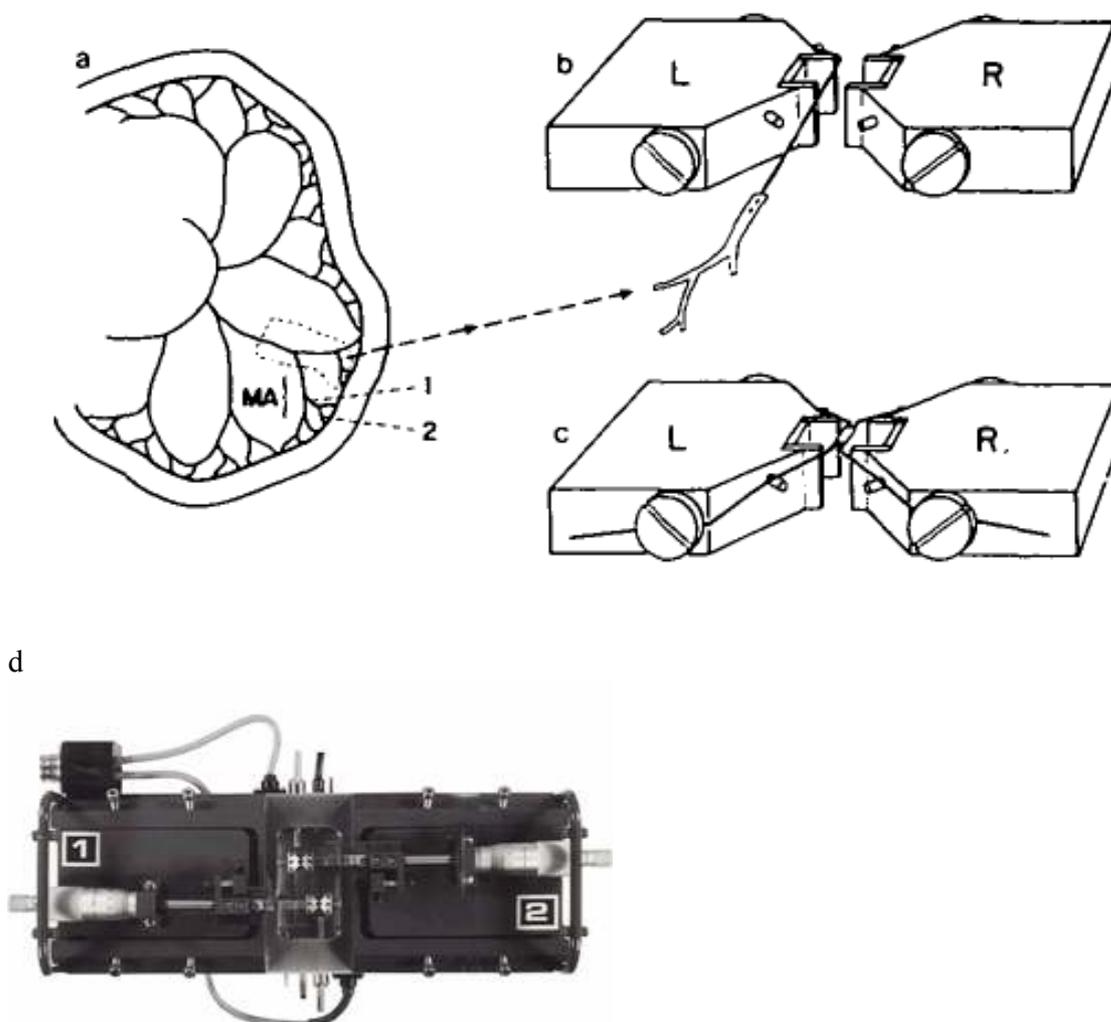
### **3.2.2. Medida da pressão arterial**

Ao final do tratamento, os ratos foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, *i.p.*) e um cateter de polietileno (PE50), preenchido com salina heparinizada (100 U/ml), foi introduzido na artéria carótida. A pressão arterial sistólica e diastólica, e frequência cardíaca, foram registradas continuamente durante 30 minutos com um transdutor de pressão (modelo 1050BP, UFI, Inc., Morro Bay, CA) e registradas usando uma interface e um software de aquisição de dados para computador (modelo MP100A, BIOPAC System, Inc. Santa Barbara, CA).

### **3.2.3. Metodologia empregada para estudo de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência**

Para estudar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência, foi utilizado o método descrito por Mulvany & Halpern (1977). Assim, após o término do tratamento e posteriormente, das medidas pressóricas, os ratos foram decapitados e o leito mesentérico removido e posto em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4° C (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO<sub>3</sub> 25; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2; EDTA 0,01 e glicose 11). Ramos de terceira ordem da artéria mesentérica superior foram dissecados e cortados em segmentos de 1,5 - 2,0 mm de comprimento com o auxílio de um microscópio de dissecação. Dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e montados em um miógrafo para vasos resistência (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) para

estudos de tensão isométrica. Um dos fios estava acoplado a um transdutor de tensão e o outro a um micrômetro que permitia o estiramento das artérias (Esquema 3). Esse miógrafo estava conectado um sistema para aquisição de dados (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e este a um computador (Macintosh).



**Esquema 3.** Esquema demonstrando os principais componentes da preparação para o estudo de vasos de resistência isolados, desenvolvido por Mulvany & Halpern (1977). (A) Leito mesentérico e seus ramos, (B) diagrama mostrando como a parte terminal da artéria é montada entre dois fios de tungstênio de 32  $\mu\text{m}$  de diâmetro cada, (C) diagrama mostrando a as placas de aço, entre as quais está montada uma artéria de até 2mm de comprimento e uma das placas está conectada a um transdutor de força de alta sensibilidade enquanto a segunda está conectada a um micrômetro, e (D) foto ilustrativa do aparelho. Modificado de Mulvany & Halpern (1977).

Depois das artérias de resistência terem sido devidamente montadas, foram estabilizadas por um período de 30 minutos em solução de Krebs-Henseleit, gaseificada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, pH 7,4) e mantida à temperatura de 37° C. Transcorrida a estabilização, as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão:diâmetro interno foi calculado e a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado in situ (L<sub>100</sub>) foi determinada (Mulvany & Halpern, 1977). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna L<sub>1</sub>, calculado como  $L_1 = 0,90 \times L_{100}$ , circunferência na qual o desenvolvimento de força é máximo (Mulvany & Halpern, 1977). O diâmetro luminal efetivo (l<sub>1</sub>) foi determinado de acordo com a equação  $l_1 = L_1/\pi$ .

Após as artérias terem sido normalizadas, foram submetidas a um período de estabilização de 30 minutos e em seguida, contraídas com cloreto de potássio (KCl 120 mM), para avaliar sua integridade funcional.

#### **3.2.4. Protocolos experimentais**

- ***Efeito do tratamento com ouabaína sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio e sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina***

Após a avaliação da integridade funcional das artérias com KCl (120 mM), as mesmas foram mantidas por um período de estabilização de 30 minutos e, então foram pré-contraídas com fenilefrina até aproximadamente 50 % da contração máxima produzida por KCl (120 mM). Após formação de um platô de contração, curvas concentração-resposta à acetilcolina (10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup>M) foram realizadas. Transcorridos um período de aproximadamente 40 minutos, foram realizadas as curvas concentração-resposta à fenilefrina (10<sup>-8</sup> - 3x10<sup>-5</sup> M).

- ***Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina***

Para avaliar a modulação endotelial sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, o endotélio de algumas artérias mesentéricas de resistência foi removido

de acordo com a metodologia descrita por Osol e colaboradores (1989). Para isso, um pelo de cavalo foi lavado com etanol e posteriormente em solução de Krebs.

Previamente à normalização da tensão de repouso dos segmentos arteriais, o pelo de cavalo foi introduzido no lúmen das mesmas e foram realizados pequenos movimentos delicados de fricção contra a parede arterial. Somente após esse procedimento é que as artérias foram normalizadas para sua tensão de repouso e em seguida, submetidas a um período de estabilização de 30 minutos. A integridade das preparações foi avaliada através da capacidade de contração das artérias ao KCl (120 mM).

Depois de submetidas à contração ao KCl, as artérias foram novamente estabilizadas por 30 min, e então, as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina a uma concentração capaz de produzir aproximadamente 50 % da contração máxima ao KCl 120 mM. A remoção do endotélio foi confirmada pela ausência de relaxamento à acetilcolina ( $10^{-6}$ M). Seguidos esses procedimentos, as preparações foram lavadas para retirada das drogas e após 40 minutos de estabilização, curvas concentração-resposta à fenilefrina ( $10^{-8}$  -  $3 \times 10^{-5}$  M) foram realizadas.

- ***Avaliação da participação enzima conversora de angiotensina e da angiotensina II sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.***

A participação da enzima conversora de angiotensina e da angiotensina II sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina foi avaliada através da utilização de captopril (10  $\mu$ M), um inibidor da enzima conversora de angiotensina, e losartan (10  $\mu$ M), um bloqueador dos receptores AT1 para angiotensina II, respectivamente. Para isso, curvas concentração-resposta a esse agente  $\alpha$ -adrenérgico foram desenvolvidas antes e após incubação por 40 minutos com esses fármacos.

- ***Avaliação da participação do óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.***

Para demonstrar a participação do óxido nítrico na resposta constritora à fenilefrina, curvas concentração-resposta a esse agente contrátil foram

desenvolvidas antes e após incubação por 40 minutos com L-NAME (100  $\mu$ M), um inibidor não seletivo da sintase de óxido nítrico.

- ***Avaliação da participação dos prostanóides e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.***

Para estudar a influência dos prostanóides da via do ácido-araquidônico-ciclooxigenase, curvas concentração-resposta à fenilefrina foram realizadas antes e após 40 minutos da pré-incubação das artérias com indometacina (10  $\mu$ M), um inibidor da ciclooxigenase, e L-NAME (100  $\mu$ M). Nesse mesmo protocolo, foi avaliada a influência do fator hiperpolarizante derivado do endotélio através da realização de uma terceira curva concentração-resposta à fenilefrina após 40 minutos da pré-incubação com tetraetilamônio (TEA, 2 mM), um bloqueador de canais para o potássio ativados por cálcio, indometacina e L-NAME.

- ***Avaliação temporal da resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina***

Com o intuito de verificar a estabilidade das preparações, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias mesentéricas uma e duas horas após realização da primeira curva à fenilefrina (0h).

- ***Avaliação da atividade funcional da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase sensível à ouabaína***

A atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase foi analisada utilizando-se a técnica de relaxamento induzido por potássio, descrita por Webb & Bohr (1978) e modificada por Rossoni e colaboradores (1999).

Após a realização da curva de relaxamento à acetilcolina, para confirmação da viabilidade endotelial, os segmentos arteriais foram estabilizados por 30 minutos em solução normal de Krebs-Henseleit, e em seguida, foram estabilizados por mais 30 minutos em solução sem potássio. Após esse período, as artérias foram pré-contraindadas com fenilefrina, e, após atingir um platô, KCl (1, 2, 4 e 6 mM) foi adicionado de maneira cumulativa em intervalos de 2 minutos e 30 segundos (Ponte *et al*, 1999a; Rossoni *et al*, 2002a). Após esse procedimento, as preparações foram incubadas com ouabaína (100  $\mu$ M) durante 30 minutos, e a curva de relaxamento ao potássio foi novamente repetida.

### **3.2.5. Western Blot**

#### **3.2.5.1. Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico e da ciclooxigenase-2**

A expressão da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e da ciclooxigenase-2 (COX-2) foi determinada através da técnica de *Western Blot*. Amostras de artérias mesentéricas, que estavam congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram homogeneizadas em solução tampão composta de: Tris (10 mM, pH=7,4), Lauril sulfato de sódio (SDS, 1%) e Metavanadato de sódio (1 mM). Os homogeneizados foram centrifugados a 6000 rpm por 10 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$  e a concentração de proteína foi medida no sobrenadante pelo método de Bradford (1976).

##### **3.2.5.1.1. Eletroforese e transferência das amostras**

Alíquotas do homogeneizado (60  $\mu\text{g}$  de proteína) foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39  $\mu\text{M}$ ; Tris-HCl pH=8 0,01 M e Azul de bromofenol 0,5 %) e após isso mantidas à temperatura de  $99^{\circ}\text{C}$  durante 4 minutos. Em seguida, foi novamente centrifugada e então, aplicada no gel com SDS a 0,1% (Lauril Sulfato Sódico-poliacrilamida - SDS-PAGE). As amostras foram submetidas a uma eletroforese com 7,5 % SDS-PAGE em um sistema Mini-Protean II (BioRad) durante 2 horas, aplicando uma corrente constante de 80 V (Power Pac 200, BioRad). O gel era composto de dois níveis, Gel1 (7,5% de acrilamida) e Gel 2 (3% de acrilamida). Em um mesmo gel foram aplicadas amostras de células endoteliais humanas como controle positivo para a eNOS (Transduction Laboratories, KY) ou macrófagos para como controle positivo para COX-2 (Transduction Laboratories, KY).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (PVDF, Transfer Membrane, Hybond P, Amersham Life Science), previamente ativada com metanol. Para a transferência, o gel, a membrana e papel Whatman foram colocados em um sistema de sanduíche e imersos em uma cuba (Mini-Protean II, Módulo de Transferência, BioRad) contendo a solução de transferência (Tris 25 mM; Glicina 190 mM; SDS 0,05 % e Metanol 20 %). O sistema foi submetido a uma corrente de 230 mA durante 20 horas.

### **3.2.5.1.2. Incubação com os anticorpos e detecção das isoformas**

As membranas foram incubadas durante 120 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação, com uma solução bloqueante (leite desnatado 5 %, soroalbumina bovina 5 %, Tris- 25 mM, NaCl 137 mM e Tween 20 0,2 %) para evitar a união não específica com reativos não imunológicos. Em seguida estas mesmas membranas foram incubadas durante 18 horas (*overnight*), com solução bloqueante contendo o anticorpo primário para a eNOS (diluição 1:2000) ou COX-2 (diluição 1:100). O anticorpo primário era monoclonal contra a isoforma eNOS (Transduction Laboratories, KY) ou COX-2 (Cayman Chemical, US). Depois disto, as membranas foram lavadas com solução de TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 0,1 %) por 40 minutos, sob agitação. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo secundário, Imunoglobulina IgG Anti-camundongo unida a peroxidase de coelho para a eNOS (Transduction Laboratories, UK. Diluição em solução bloqueante: 1:5000) ou IgG Anti-coelho unida a peroxidase de coelho para a COX-2 (Transduction Laboratories, UK. Diluição em solução bloqueante: 1:2000), por 90 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação. A proteína correspondente a eNOS ou a COX-2 foi detectada por uma reação de quimiluminescência, utilizando um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham Life Science) incubando as membranas por 8 minutos. As membranas foram colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham Life Science), e as bandas impregnadas posteriormente reveladas. As bandas das proteínas foram quantificadas mediante análise densitométrica. Para tal, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram gravados por um scanner conectado a um computador. Para análise das bandas e a quantificação da área e da densidade das bandas foi utilizado um programa de análise de imagens (Image J).

As mesmas membranas utilizadas para detecção da expressão protéica para eNOS ou COX-2 foram utilizadas para detecção de  $\alpha$ -actina (Transduction Laboratories, UK. Diluição em solução bloqueante: 1:5000 no caso do anticorpo monoclonal e 1:5000, no caso do IgG Anti-coelho unida a peroxidase de coelho), visto que a densidade óptica para eNOS e COX-2 foram normalizadas em relação à  $\alpha$ -actina.

### 3.3. Expressão dos resultados e análises estatísticas

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os valores de “n” representam o número de animais utilizados em cada protocolo experimental.

As respostas vasopressoras induzidas pela fenilefrina, na perfusão do leito arterial caudal, são expressas como mudanças na pressão de perfusão, subtraindo o pico de resposta pressora à fenilefrina pela pressão de perfusão basal.

Os resultados das respostas de relaxamento induzido pela acetilcolina e pelo nitroprussiato de sódio, no leito arterial caudal, são expressos como porcentagem de relaxamento induzido por estes fármacos.

Os resultados das respostas contráteis obtidos em artérias mesentéricas de resistência foram normalizados em função da resposta máxima obtida com KCl (120 mM), considerada como 100% da resposta contrátil do músculo. Já as respostas de relaxamento, foram expressas como porcentagem de relaxamento das contrações induzidas por agonistas.

Para a determinação dos valores de resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e  $EC_{50}$  para fenilefrina ou a acetilcolina, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtido através da análise das curvas concentração-resposta utilizando o programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA). A sensibilidade dos agonistas foram expressas como  $EC_{50}$ . Alguns resultados foram expressos como diferenças da área sob a curva de concentração-resposta (dAUC) à fenilefrina em situações controle e experimentais. A AUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC) da curva controle correspondente (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A). Outros resultados também foram expressos como produto da razão entre as sensibilidades obtidas através das curvas concentração-resposta à fenilefrina em determinadas condições experimentais.

Resultados da expressão da eNOS e COX-2 foram expressos como a relação entre a densidade óptica para eNOS e COX-2 em relação à  $\alpha$ -actina.

A análise dos resultados foi realizada utilizando-se teste  $T$ , pareado e/ ou não pareado, e análise de variância (ANOVA), uma e/ou duas vias, medidas repetidas ou completamente randomizada. Quando a ANOVA apresentava significância estatística o teste *post-hoc* de Bonferroni era realizado (GraphPad Prism Software,

San Diego, CA, E.U.A). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de  $P < 0,05$ .

### 3.4. Fármacos e reagentes a utilizados

- 2-Hidroxietilmercaptano ( $\beta$ -mercaptoetanol) (Sigma)
- 3', 3'', 5', 5''-Tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódico (Azul de Bromofenol) (Sigma)
- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido acético glacial (Probus)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma)
- Ácido hidroxietilpiperazina etanosulfônico (HEPES) (Sigma)
- Albumina bovina (Sigma)
- Anticorpo de camundongo anti-eNOS (Anti-eNOS) (Transduction Laboratories)
- Anticorpo de camundongo anti-COX-2 (Anti-COX-2) (Cayman Chemical)
- Anti-imunoglobulina G de camundongo (Transduction Laboratories)
- Anti-imunoglobulina G de coelho (Transduction Laboratories)
- Bicarbonato de sódio (Pancreac)
- Captopril (Sigma)
- Cloreto de cálcio (Pancreac)
- Cloreto de potássio (Pancreac)
- Cloreto de sódio (Pancreac)
- Controle positivo para eNOS (Células endoteliais) (Transduction Laboratories)
- Controle positivo para COX-2 (macrófagos) (Transduction Laboratories)
- CHAPS,(3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propanosulfonato) (Sigma)
- DL-Ditiotreitol (DTT) (Sigma)

- Etanol absoluto (Probus)
- Éter sulfúrico (Pancreac)
- Fosfato de potássio (Pancreac)
- Fosfato de sódio (Merck)
- Glicerol (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Indometecina (Sigma)
- Lauril sulfato sódico (SDS) (BioRad)
- Leite desnatado Sveltesse (Nestlé)
- l-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Losartan (Merck)
- Metanol (Merck)
- N, N, N', N'-Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- N, N'-Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (BioRad)
- N(W)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), dicloridrato (Sigma)
- Nitroprussiato de sódio, dihidratado (Sigma)
- Ouabaína, octahidrato (Sigma)
- Persulfato Amônico (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (BioRad)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL plus) (Amersham Life Science, Pharmacia biotech)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merck)
- Tetraetilamônio, cloridrato (Sigma)
- Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) (BioRad)
- Uréia (Sigma)
- Uretana (Sigma)

Todas as soluções concentradas ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  M) foram dissolvidas em água bidestilada e mantidas no congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Somente a indometacina foi dissolvida em uma solução de bicarbonato de sódio 1,5 mM. As diluições necessárias eram preparadas recentemente, em cada dia de experimento. As soluções utilizadas para os experimentos *“in vivo”* foram dissolvidas em solução salina (NaCl 0,9%).

## **RESULTADOS**

## 4. Resultados

### 4.1. Experimentos agudos “*in vivo*”

#### 4.1.1. Dados ponderais, valores pressóricos e de frequência cardíaca em animais anestesiados.

Os animais normotensos (Wistar e WKY) e hipertensos (SHR) não apresentaram diferenças nos valores de massa corporal (Wistar:  $298 \pm 6$  g; WKY:  $289 \pm 5$  g; SHR:  $294 \pm 8$  g. ANOVA -1 via,  $P > 0,05$ ).

Em relação aos níveis pressóricos em animais anestesiados, os ratos SHR apresentaram níveis de pressão arterial sistólica e diastólica aumentados quando comparados tanto aos ratos WKY quanto aos Wistar (Tabela 1). Os valores de frequência cardíaca não diferiram entre os animais Wistar e SHR, embora tenham sido estatisticamente diferentes quando comparados os animais WKY e SHR (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca de ratos Wistar, WKY e SHR, anestesiados.

	<b>Wistar</b>	<b>WKY</b>	<b>SHR</b>
<b>PAS (mmHg)</b>	$102 \pm 5$ (N=9)	$112 \pm 2$ (N=11)	$133 \pm 4^{*+}$ (N=10)
<b>PAD (mmHg)</b>	$70 \pm 5$ (N=9)	$68 \pm 3$ (N=11)	$91 \pm 3^{*+}$ (N=10)
<b>FC (bpm)</b>	$314 \pm 15$ (N=9)	$285 \pm 10$ (N=11)	$338 \pm 16^+$ (N=10)

PAS – Pressão Arterial Sistólica; PAD – Pressão Arterial Diastólica e FC – Frequência Cardíaca.

Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

ANOVA (uma via),  $^*P < 0,05$  vs SHR.  $^+P < 0,05$  WKY vs SHR.

#### **4.1.2. Efeito da ouabaína na pressão arterial de ratos anestesiados**

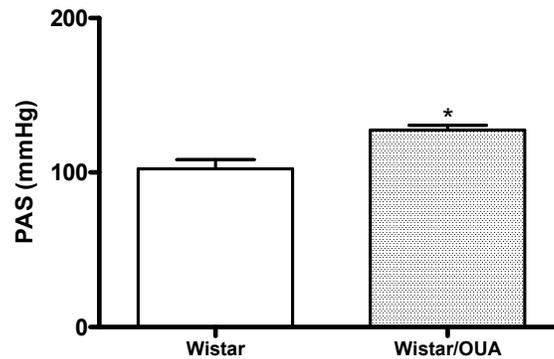
Todos os ratos utilizados nos estudos *in vivo* foram anestesiados com uretana. Esse anestésico, de maneira similar, reduziu a pressão arterial sistólica e diastólica nos 3 grupos estudados (comparar tabela 1 e tabela 2), conforme já descrito na literatura (Vassallo *et al*, 1997; Rossoni *et al*, 2001; Rossoni *et al*, 2003).

Após um período de estabilização de 30 minutos, foi administrada ouabaína e ao final de 60 minutos após essa administração, os animais Wistar e SHR (Figura 1A e 1C) apresentaram um aumento significativo da pressão arterial sistólica (Wistar:  $102 \pm 6$  mmHg vs Wistar/OUA:  $128 \pm 3$  mmHg; SHR:  $131 \pm 6$  mmHg vs SHR/OUA:  $153 \pm 3$  mmHg. Teste *t*,  $P < 0,05$ ). No entanto, nos animais WKY (Figura 1B), a administração de ouabaína não produziu nenhuma alteração na PAS (WKY:  $111 \pm 3$  mmHg vs WKY/OUA:  $111 \pm 4$  mmHg. Teste *t*,  $P > 0,05$ ).

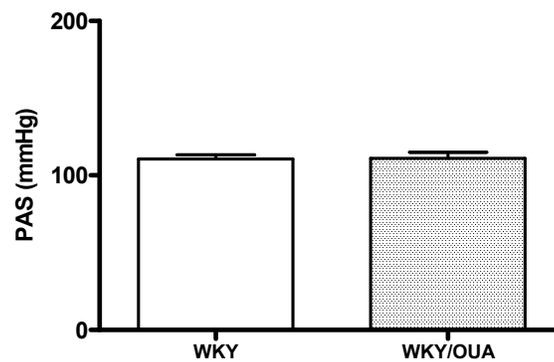
De maneira similar, a ouabaína também foi capaz de elevar a pressão arterial diastólica (Figura 2A e 2C) nos animais Wistar e SHR (Wistar:  $73 \pm 9$  mmHg vs Wistar/OUA:  $111 \pm 8$  mmHg; SHR:  $95 \pm 3$  mmHg vs SHR/OUA:  $127 \pm 4$  mmHg. Teste *t*,  $P < 0,05$ ). Porém, nos animais WKY (Figura 2B), a administração desse glicosídeo reduziu a pressão arterial diastólica (WKY:  $66 \pm 4$  mmHg vs WKY/OUA:  $56 \pm 3$  mmHg. Teste *t*,  $P < 0,05$ ).

A frequência cardíaca (Figura 3) não foi modificada pela administração de ouabaína em nenhum dos 3 grupos estudados (Wistar:  $311 \pm 26$  bpm vs Wistar/OUA:  $384 \pm 9$  bpm; WKY:  $287 \pm 11$  bpm vs WKY/OUA:  $310 \pm 17$  bpm; SHR:  $359 \pm 24$  bpm vs SHR/OUA:  $386 \pm 13$  bpm. Teste *t*,  $P > 0,05$ ).

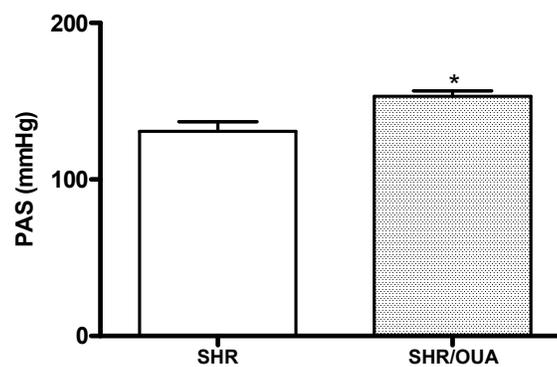
A)



B)

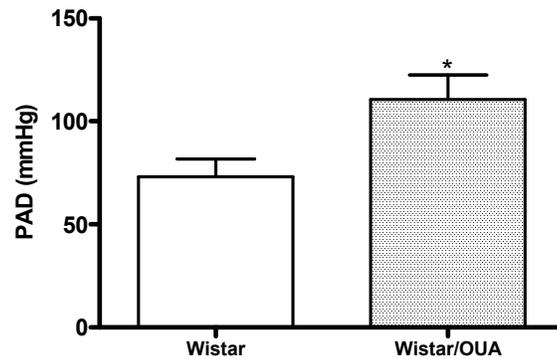


C)

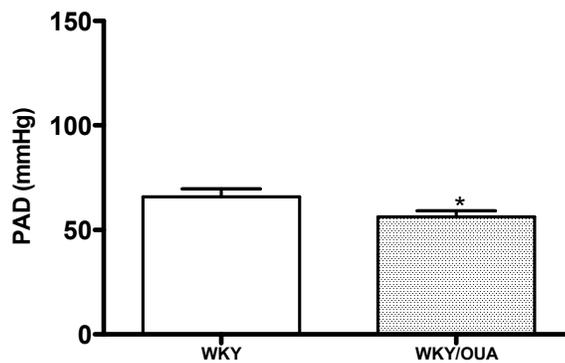


**Figura 1.** Valores de pressão arterial sistólica (PAS) em ratos Wistar (A, N=5), WKY (B, N=7) e SHR (C, N=6) anestesiados com uretana, antes (barras claras) e após (barras pontilhadas) 60 minutos da administração de 18  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de ouabaína. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste T: \*  $P < 0,05$  vs antes da administração de ouabaína.

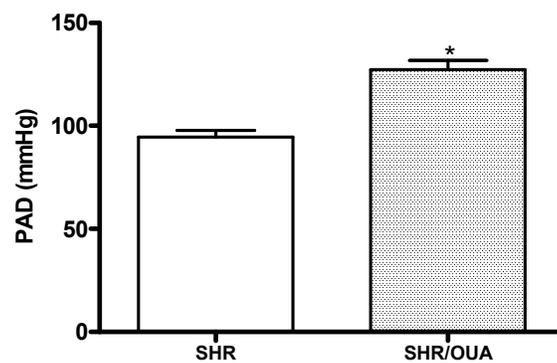
A)



B)

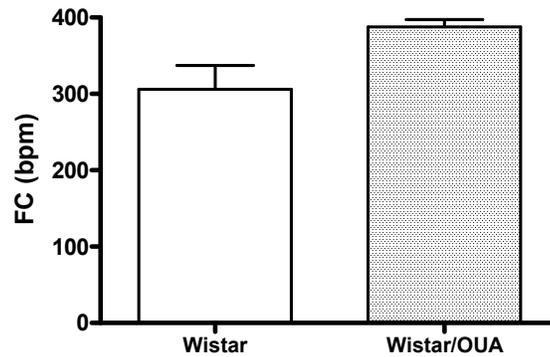


C)

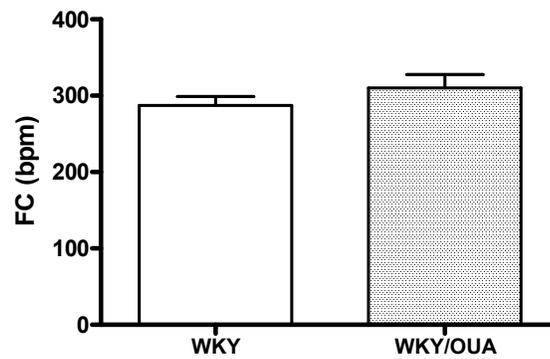


**Figura 2.** Valores de pressão arterial diastólica (PAD) em ratos Wistar (A, N=5), WKY (B, N=7) e SHR (C, N=6) anestesiados com uretana, antes (barras claras) e após (barras pontilhadas) 60 minutos da administração de 18 µg/Kg de ouabaína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste T: \* P < 0,05 vs antes da administração de ouabaína.

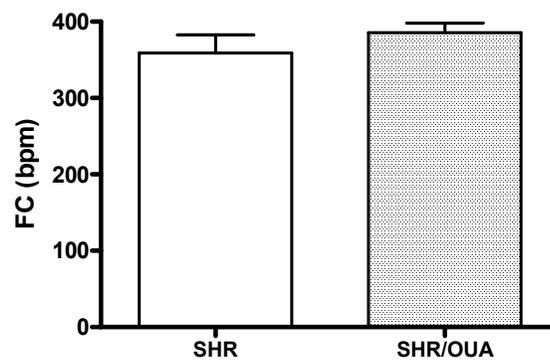
A)



B)



C)



**Figura 3.** Valores de frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar (A, N=5), WKY (B, N=7) e SHR (C, N=6) anestesiados com uretana, antes (barras claras) e após (barras pontilhadas) 60 minutos da administração de 18  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de ouabaína. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste *T*:  $P > 0,05$ .

#### **4.1.3. Efeito do bloqueio dos receptores AT1 para angiotensina II sobre as ações da ouabaína na pressão arterial**

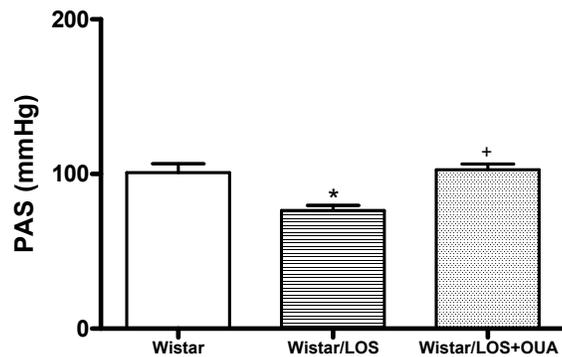
Para analisar a participação da angiotensina II nos efeitos da ouabaína, foi administrado losartan, um bloqueador dos receptores AT1 para angiotensina II, depois de transcorridos um período de estabilização de 30 minutos e antes da administração de ouabaína.

A administração de losartan (Figura 4) *per se* reduziu significativamente a pressão arterial sistólica nos 3 grupos de animais estudados (Wistar:  $101 \pm 6$  mmHg vs Wistar/LOS:  $76 \pm 3$  mmHg; WKY:  $114 \pm 0,6$  mmHg vs WKY/LOS:  $94 \pm 3$  mmHg; SHR:  $133 \pm 6$  mmHg vs SHR/LOS:  $106 \pm 5$  mmHg. ANOVA 1 via,  $P < 0,05$ ). No entanto, como é possível observar na Figura 4A e 4C, esse fármaco não foi capaz de bloquear os efeitos pressores da ouabaína nos animais Wistar e SHR (Wistar/LOS:  $76 \pm 3$  mmHg vs Wistar/LOS+OUA:  $103 \pm 4$  mmHg; SHR/LOS:  $106 \pm 5$  mmHg vs SHR/LOS+OUA:  $150 \pm 5$  mmHg. ANOVA 1 via,  $P < 0,05$ ). Já nos animais WKY (Figura 4B), a pressão arterial sistólica em presença de losartan não foi modificada após a administração de ouabaína (WKY/LOS:  $94 \pm 3$  mmHg vs WKY/LOS+OUA:  $101 \pm 3$  mmHg. ANOVA 1 via,  $P > 0,05$ ). Lembrar que a administração de ouabaína não produzia efeitos sobre a pressão arterial sistólica (Figura 1B) nesses animais.

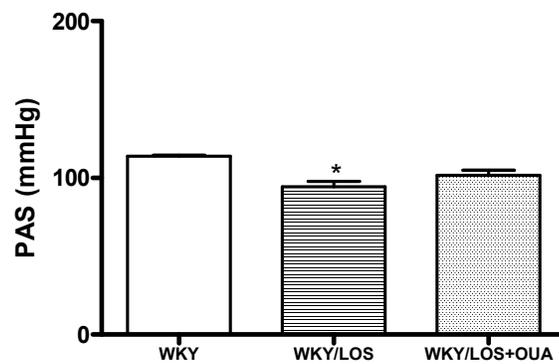
A pressão arterial diastólica (Figura 5) foi reduzida significativamente após a administração de losartan em todos os grupos estudados (Wistar:  $67 \pm 6$  mmHg vs Wistar/LOS:  $38 \pm 0,4$  mmHg; WKY:  $71 \pm 3$  mmHg vs WKY/LOS:  $38 \pm 4$  mmHg; SHR:  $87 \pm 6$  mmHg vs SHR/LOS:  $62 \pm 4$  mmHg. ANOVA 1 via,  $P < 0,05$ ). Nos ratos Wistar, esse fármaco bloqueou os efeitos pressores da ouabaína sobre a pressão arterial diastólica (comparar Figuras 2A e 5A) (Wistar/LOS:  $38 \pm 0,4$  mmHg vs Wistar/LOS+OUA:  $54 \pm 5$  mmHg. ANOVA 1 via,  $P > 0,05$ ). Entretanto, esse efeito não foi observado nos animais SHR (SHR/LOS:  $62 \pm 4$  mmHg vs SHR/LOS+OUA:  $81 \pm 5$ . ANOVA 1 via,  $P < 0,05$ ), ou seja, a ouabaína incrementou a pressão arterial diastólica mesmo em presença de losartan, similar ao que ocorreu na pressão arterial sistólica. Já nos animais WKY (Figura 5B), a administração de ouabaína não promoveu efeito adicional sobre as respostas encontradas com losartan (WKY/LOS:  $38 \pm 4$  mmHg vs WKY/LOS+OUA:  $35 \pm 3$  mmHg. ANOVA 1 via,  $P > 0,05$ ).

A frequência cardíaca não foi modificada pela presença de losartan ou losartan + ouabaína em todos os grupos estudados (Wistar:  $318 \pm 6$  bpm vs Wistar/LOS:  $311 \pm 10$  bpm vs Wistar/LOS+OUA:  $356 \pm 23$  bpm; WKY:  $280 \pm 22$  bpm vs WKY/LOS:  $268 \pm 25$  bpm vs WKY/LOS+OUA:  $292 \pm 18$  bpm; SHR:  $312 \pm 13$  bpm vs SHR/LOS:  $293 \pm 27$  bpm vs SHR/LOS+OUA:  $341 \pm 16$  bpm. ANOVA 1 via,  $P < 0,05$ ).

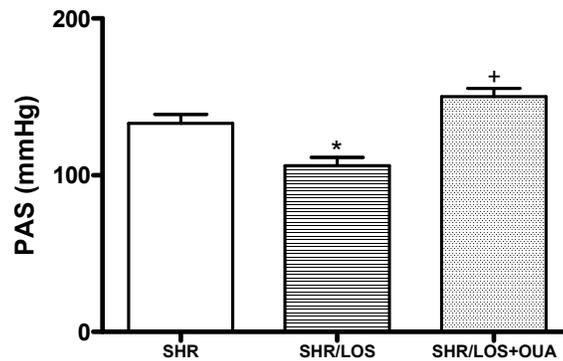
A)



B)

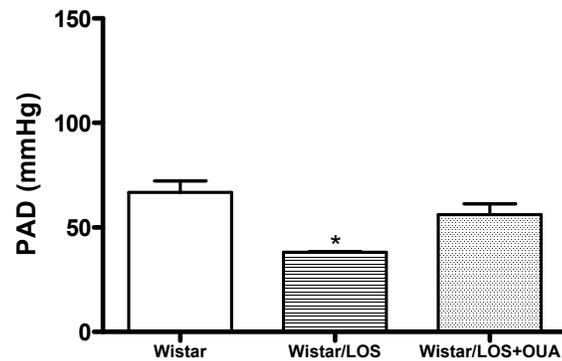


C)

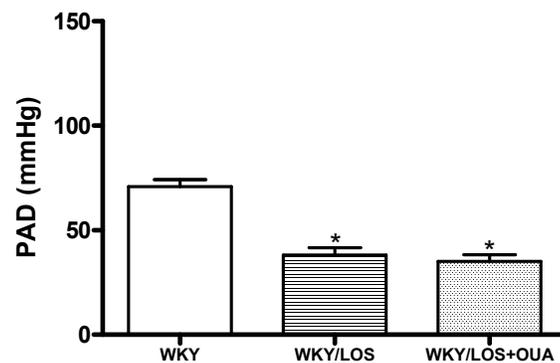


**Figura 4.** Valores de pressão arterial sistólica (PAS) em ratos Wistar (A, N=4), WKY (B, N=4) e SHR (C, N=5) anestesiados com uretana, antes (barras claras) e após (barras pontilhadas) 30 minutos da administração de losartan e após (barras pontilhadas) após 60 minutos da administração de 18 µg/Kg de ouabaína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA 1 Via: \* P < 0,05 vs antes da administração de losartan; <sup>+</sup> P < 0,05 vs após a administração de losartan.

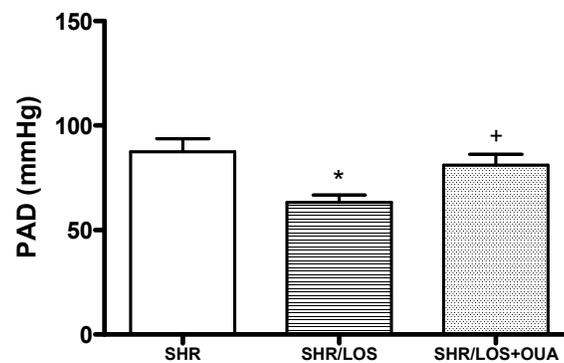
A)



B)



C)



**Figura 5.** Valores de pressão arterial diastólica (PAD) em ratos Wistar (A, N=4), WKY (B, N=4) e SHR (C, N=5) anestesiados com uretana, antes (barras claras) e após (barras pontilhadas) 30 minutos da administração de losartan e após (barras pontilhadas) após 60 minutos da administração de 18 µg/Kg de ouabaína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA 1 Via: \* P < 0,05 vs antes da administração de losartan; + P < 0,05 vs após a administração de losartan.

## 4.2. Experimentos agudos “*in vitro*”

### 4.2.1. Dados ponderais, valores pressóricos e de frequência cardíaca em animais acordados.

O peso corporal dos 3 grupos de animais estudados não diferiram entre si (Wistar:  $286 \pm 6$  g; WKY:  $271 \pm 7$  g; SHR:  $268 \pm 5$  g. ANOVA 1 via,  $P > 0,05$ ).

Os animais SHR apresentaram níveis de pressão arterial sistólica e diastólica aumentados quando comparados aos animais Wistar ou aos WKY (Tabela 2). Os valores de frequência cardíaca, da mesma forma como ocorreu nos ratos anestesiados (Tabela 1), não diferiram entre os animais Wistar e SHR, embora tenham sido estatisticamente diferentes entre os animais WKY e SHR (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca de ratos Wistar, WKY e SHR, acordados.

	WKY	Wistar	SHR
<b>PAS (mmHg)</b>	$122 \pm 3$ (N=21)	$123 \pm 2$ (N=26)	$205 \pm 2^*$ (N=30)
<b>PAD (mmHg)</b>	$92 \pm 3$ (N=21)	$94 \pm 3$ (N=26)	$160 \pm 3^*$ (N=30)
<b>FC (bpm)</b>	$343 \pm 7$ (N=21)	$356 \pm 4$ (N=26)	$364 \pm 5^+$ (N=30)

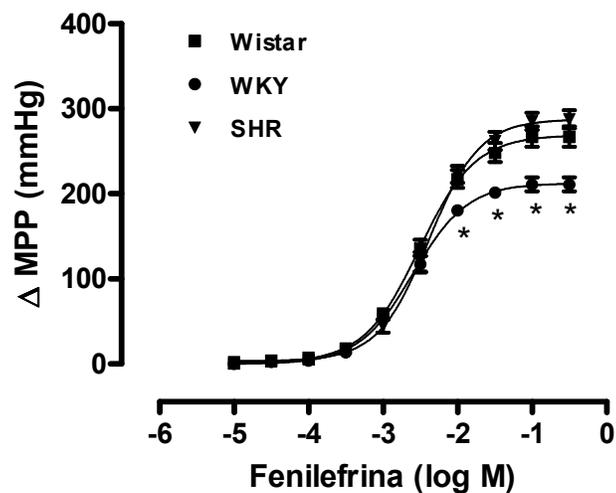
PAS – Pressão Arterial Sistólica; PAD – Pressão Arterial Diastólica e FC – Frequência Cardíaca. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

ANOVA (1 via), \* $P < 0,05$  SHR vs Wistar e WKY; + $P < 0,05$  WKY vs SHR.

### 4.2.2. Resposta vasoconstritora à fenilefrina e resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina

A resposta de relaxamento mediada pelo endotélio foi avaliada através da administração de uma única dose *in bolus* de acetilcolina ( $5\mu\text{g}$ ), em artérias previamente contraídas com fenilefrina. A magnitude da resposta de relaxamento à acetilcolina foi similar nos 3 grupos estudados (Wistar:  $-68,5 \pm 2,5$  mmHg; WKY:  $-67,8 \pm 2,7$  mmHg; SHR:  $-72,5 \pm 2,2$  mmHg. ANOVA 1 via,  $P > 0,05$ ).

A fenilefrina aumentou, de maneira dose-dependente, a média da pressão de perfusão do leito vascular caudal nos três grupos estudados. Não houve diferenças na sensibilidade ( $EC_{50}$ ) e resposta máxima ( $R_{máx}$ ) à fenilefrina entre os ratos Wistar e SHR (Figura 6; tabela 3). No entanto, ao se avaliar a resposta pressora à fenilefrina nos animais WKY, observou-se que os mesmos apresentavam uma redução na resposta máxima à fenilefrina quando comparados aos animais Wistar e SHR (Figura 6; tabela 3).



**Figura 6.** Mudanças na média da pressão de perfusão ( $\Delta MPP$ ; mmHg), induzidas por doses crescentes de fenilefrina, no leito vascular caudal de animais Wistar ( $n=26$ , quadrados cheios), WKY ( $n=14$ , círculos cheios) e SHR ( $n=26$ , triângulos cheios). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão a média.

ANOVA (duas vias): \*  $P < 0,05$  vs Wistar e SHR.

**Tabela 3:** Valores de EC50 e resposta máxima (R<sub>máx</sub>, mmHg) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias caudal de ratos Wistar, WKY e SHR.

	<b>Wistar</b>	<b>WKY</b>	<b>SHR</b>
<b>EC50</b>	0,004 ± 0,0006	0,003 ± 0,0004	0,005 ± 0,0005
<b>R<sub>máx</sub></b>	267 ± 12,0	215 ± 8*	288 ± 11

EC50 – Sensibilidade; R<sub>máx</sub> – Resposta máxima. Valores são expressos como média ± EPM.

ANOVA (uma via): \* P < 0,05 vs. Wistar e SHR.

#### **4.2.3. Efeito da administração aguda de 1 µM de ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito vascular caudal de ratos**

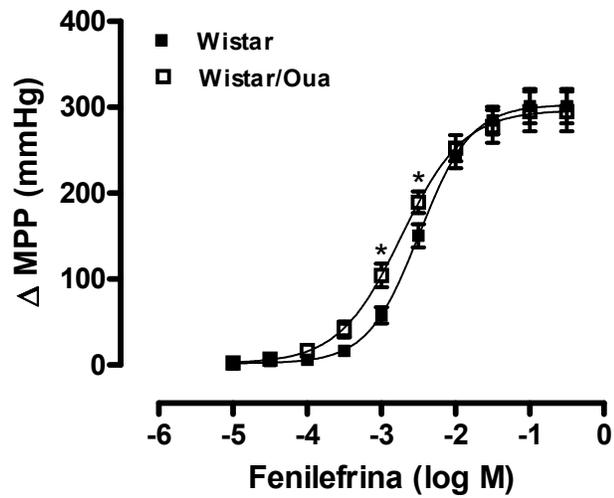
Dados anteriores do nosso laboratório (Padilha *et al*, 2004) já demonstraram que a infusão contínua com solução de Krebs-Henseleit por 60 minutos não modifica a reatividade à fenilefrina nem a média da pressão de perfusão basal nos animais Wistar, WKY e SHR. Devido a isso, não foi realizado o protocolo temporal de reatividade à fenilefrina no presente estudo.

A perfusão por 60 minutos com 1 µM de ouabaína não foi capaz de alterar a média da pressão de perfusão basal nos animais normotensos (Wistar: 96,4 ± 3,9 mmHg vs Wistar/OUA: 100,1 ± 3,5 mmHg ; WKY: 85,4 ± 4,3 mmHg vs WKY/OUA: 80,1 ± 9 mmHg. Teste *T*, P > 0,05). No entanto, nos animais SHR, a perfusão com ouabaína elevou a média da pressão de perfusão basal de forma significativa (SHR: 87,8 ± 4,9 mmHg vs SHR/OUA: 95,5 ± 5,2 mmHg. Teste *T*, P < 0,05).

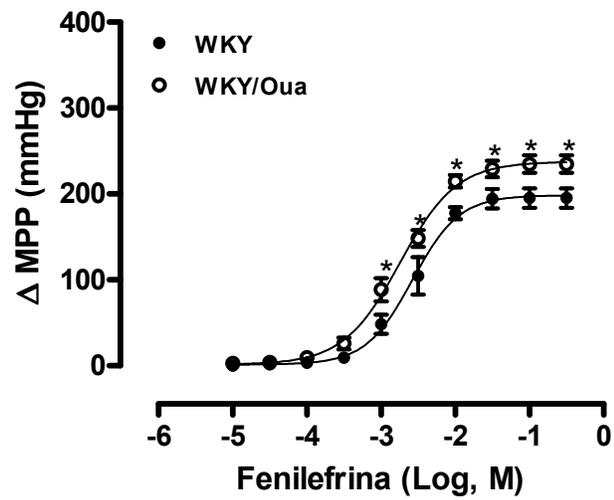
A administração de fenilefrina aumentou, de maneira concentração-dependente, a média da pressão de perfusão nas artérias de animais normotensos e hipertensos (Figura 7). Nos animais Wistar, a sensibilidade a este agonista alfa-1 adrenérgico foi elevada após perfusão por 60 minutos com ouabaína (Figura 7A e Tabela 4). Já nos

animais WKY e SHR, tanto a sensibilidade quanto a resposta máxima foram aumentadas por esse glicosídeo (Figura 7B e 7C, Tabela 4).

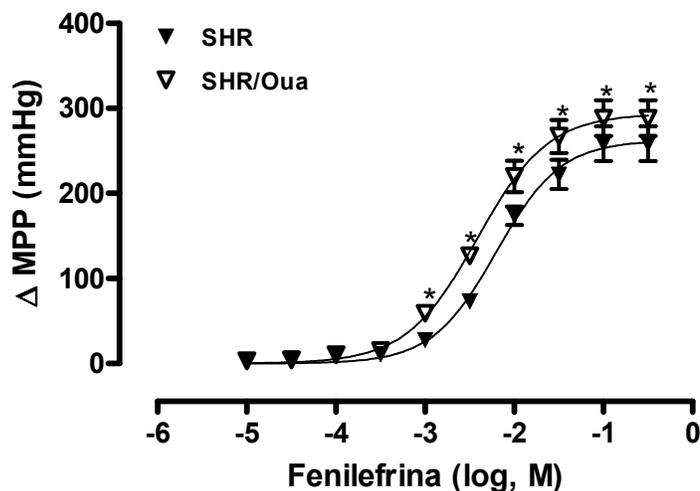
A)



B)



c)



**Figura 7.** Mudanças na média da pressão de perfusão ( $\Delta$ MPP; mmHg), induzidas por doses crescentes de fenilefrina, no leito vascular caudal de animais Wistar (A,  $n = 9$ ), WKY (B,  $n = 5$ ) e SHR (C,  $n = 8$ ) antes (símbolos cheios) e após (símbolos vazios) perfusão por 60 minutos com ouabaína. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão a média.

ANOVA (duas vias): \*  $P < 0,05$  vs antes da perfusão com ouabaína.

**Tabela 4.** Valores de EC<sub>50</sub> e resposta máxima (R<sub>máx</sub>, mmHg) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias caudal de ratos Wistar ( $n = 9$ ), WKY ( $n = 5$ ) e SHR ( $n = 8$ ) antes e após perfusão com 1  $\mu$ M de ouabaína.

	EC <sub>50</sub>		R <sub>máx</sub>	
	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>Wistar</b>	0,004 $\pm$ 0,0006	0,002 $\pm$ 0,0005*	301,3 $\pm$ 19,8	295,1 $\pm$ 23,0
<b>WKY</b>	0,003 $\pm$ 0,0007	0,002 $\pm$ 0,0004*	195,2 $\pm$ 11,3	234,8 $\pm$ 10,1*
<b>SHR</b>	0,006 $\pm$ 0,001	0,004 $\pm$ 0,001*	258,4 $\pm$ 20,4	288,4 $\pm$ 20,1*

EC<sub>50</sub> – Sensibilidade; R<sub>máx</sub> – Resposta máxima. Valores são expressos como média  $\pm$  EPM.

Teste T: \*  $P < 0,05$  vs antes da perfusão com ouabaína.

**Tabela 5.** Valores de EC50 e resposta máxima (R<sub>máx</sub>, mmHg) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias caudal de ratos Wistar (n = 9-7), WKY (n = 5-5) e SHR (n = 7-5) antes (E+) e após lesão endotelial (E-).

	EC50		R <sub>máx</sub>	
	E+	E-	E+	E-
<b>Wistar</b>	0,004 ± 0,0006	0,001 ± 0,0004*	301,3 ± 19,8	347,5 ± 29,3
<b>WKY</b>	0,003 ± 0,0007	0,0005 ± 0,0001*	195 ± 11,34	279,0 ± 32,5*
<b>SHR</b>	0,006 ± 0,001	0,001 ± 0,0002*	258,4 ± 20,4	391,2 ± 44,7*

EC50 – Sensibilidade; R<sub>máx</sub> – Resposta máxima. Valores são expressos como média ± EPM.

Teste T: \* P < 0,05 vs após lesão endotelial (E-).

#### **4.2.4. Modulação do endotélio no efeito da ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina**

Recente trabalho do nosso laboratório (Padilha *et al*, 2004) demonstrou que a lesão endotelial provocada por CHAPS em artérias caudais, tanto de Wistar como de WKY e SHR, promove aumento da média da pressão de perfusão basal comparada às artérias de animais com endotélio intacto. Outro dado relevante desse mesmo trabalho, é que a infusão com solução de Krebs-Henseleit por 60 minutos não modifica a média da pressão de perfusão nessas artérias com endotélio lesado nem a reatividade vascular à fenilefrina. Assim sendo, não realizamos os protocolos temporais acima mencionados.

Após lesão endotelial, a sensibilidade à fenilefrina foi aumentada nos ratos Wistar, sem modificar, no entanto, a resposta máxima (Tabela 5). Já nos animais WKY e SHR, tanto a sensibilidade quanto à resposta máxima (Tabela 5) foram elevadas pela lesão endotelial.

Para analisar se o grau de deslocamento da sensibilidade à fenilefrina obtida através das curvas concentração-resposta a esse fármaco antes e após lesão endotelial entre os três grupos estudados era diferente, foi utilizado o cálculo da razão dessa sensibilidade nas condições com e sem endotélio. Dessa forma, observou-se que

o efeito da remoção do endotélio não foi diferente entre os grupos estudados (Razão EC50 - Wistar E+/E-:  $0,409 \pm 0,121$ ; WKY E+/E-:  $0,244 \pm 0,094$ ; SHR E+/E-:  $0,146 \pm 0,031$ . Teste *T*,  $P > 0,05$ ).

Para averiguar se os efeitos pressores da ouabaína eram dependentes do endotélio, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina, na ausência do endotélio funcional, antes e após perfusão por 60 minutos com ouabaína.

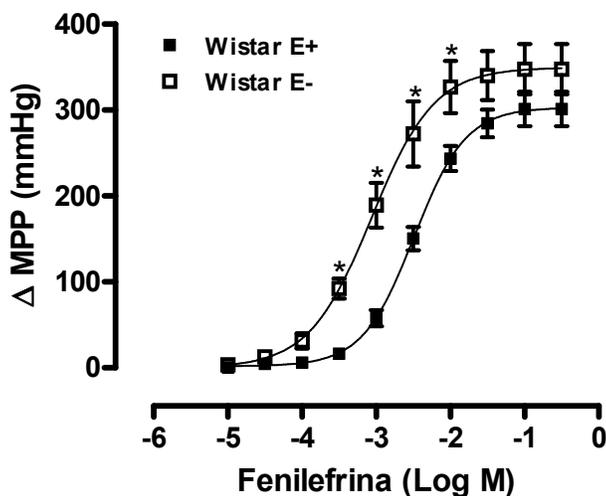
A perfusão por 60 minutos com  $1 \mu\text{M}$  de ouabaína não foi capaz de alterar a média da pressão de perfusão basal na ausência do endotélio funcional nos 3 grupos estudados (Wistar:  $106,1 \pm 5,6$  mmHg vs Wistar/OUA:  $98,7 \pm 4,3$  mmHg; WKY:  $125,6 \pm 5,8$  mmHg vs WKY/OUA:  $104,3 \pm 5,9$  mmHg; SHR:  $124,0 \pm 6,5$  mmHg vs SHR/OUA:  $104,5 \pm 6,5$  mmHg. Teste *T*,  $P > 0,05$ ).

Tanto nos animais Wistar (Figura 9A) como nos animais WKY (Figura 9B), a perfusão com ouabaína não alterou nem a sensibilidade nem a resposta máxima à fenilefrina (EC50 – Wistar E-:  $0,001 \pm 0,0004$  vs Wistar E-/OUA:  $0,0009 \pm 0,0002$ ; WKY E-:  $0,0005 \pm 0,0001$  vs WKY E-/OUA:  $0,0005 \pm 0,0002$ . R<sub>máx</sub> – Wistar E-:  $347,5 \pm 29,3$  mmHg vs Wistar E-/OUA:  $323,3 \pm 32,5$  mmHg; WKY E-:  $279,0 \pm 32,5$  mmHg vs WKY E-/OUA:  $259,9 \pm 15,9$  mmHg. Teste *T*,  $P > 0,05$ ). Da mesma forma, nos animais SHR (Figura 9B) a ouabaína não produziu nenhuma modificação nos parâmetros de sensibilidade e resposta máxima à fenilefrina (EC50 – SHR E-:  $0,001 \pm 0,0002$  vs SHR E-/OUA:  $0,001 \pm 0,0003$ . R<sub>máx</sub> – SHR E-:  $391,2 \pm 44,7$  mmHg vs SHR E-/OUA:  $406,0 \pm 41,2$  mmHg. Teste *T*,  $P > 0,05$ ). Desse modo, pode-se sugerir que os efeitos da ouabaína sobre a reatividade vascular à fenilefrina observada nos animais normotensos e hipertensos são dependentes do endotélio.

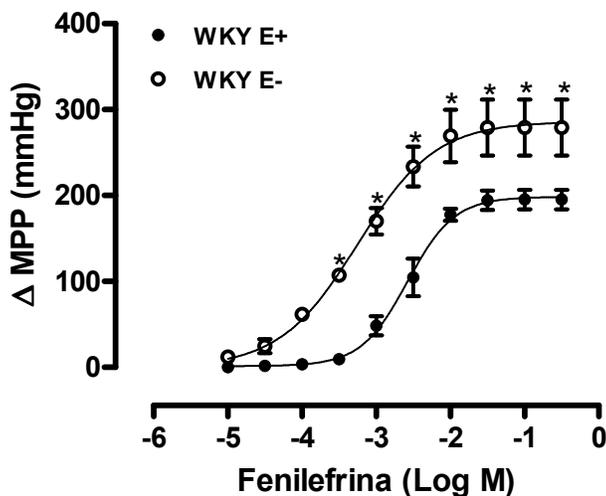
A lesão endotelial foi confirmada nos três grupos estudados através da resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina, praticamente abolida após administração de CHAPS (Wistar E+:  $-72,2 \pm 4,1$  vs Wistar E-:  $-3,2 \pm 1,5\%$ ; WKY E+:  $-74,4 \pm 4,5$  vs WKY E-:  $-7,2 \pm 1,1\%$ ; SHR E+:  $-68,7 \pm 5,4$  vs SHR E-:  $-6,8 \pm 2,1\%$ . Teste *T*,  $P < 0,05$ ). Para descartar qualquer possibilidade de lesão muscular após a lesão endotelial, foi

administrado nitroprussiato de sódio, um vasodilatador independente do endotélio. Não foi observada modificação na resposta de relaxamento induzida por esse fármaco antes a após a lesão endotelial (Wistar E+:  $-75,6 \pm 2,9$  % vs Wistar E-:  $-71,0 \pm 5,1$  %; WKY E+:  $-77,0 \pm 3,1$  % vs WKY E-:  $-74,4 \pm 4,0$  %; SHR E+:  $-72,5 \pm 2,6$  % vs SHR E-:  $-70,5 \pm 1,5$  %. Teste *T*,  $P > 0,05$ ).

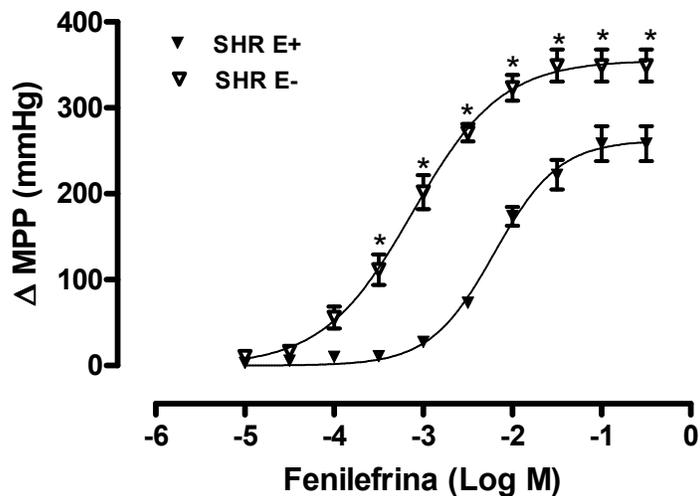
A)



B)

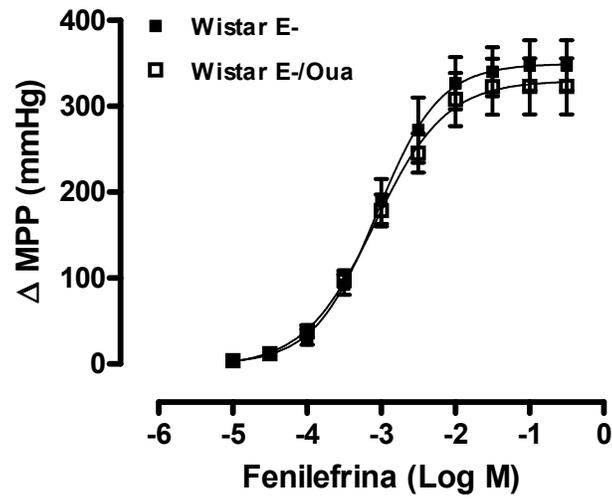


C)

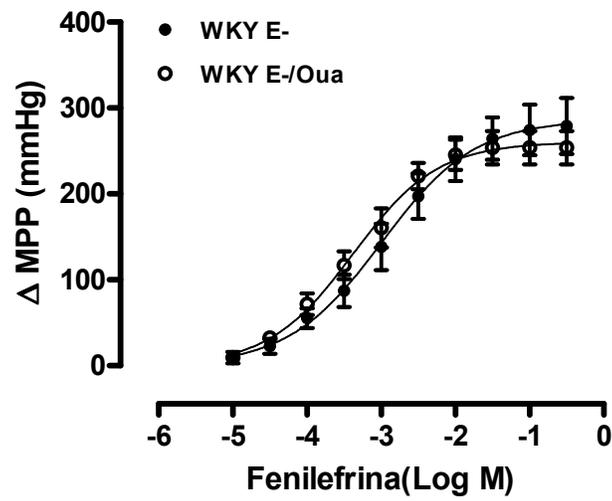


**Figura 8.** Mudanças na média da pressão de perfusão ( $\Delta$ MPP; mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina no leito vascular caudal de ratos Wistar (A, n = 9 - 7), WKY (B, n = 5 - 5) e SHR (B, n = 7 - 5), nas condições com endotélio (símbolos cheios) e após lesão endotelial com CHAPS (símbolos vazios). ANOVA (duas vias): \* P < 0,05 vs em condições com endotélio.

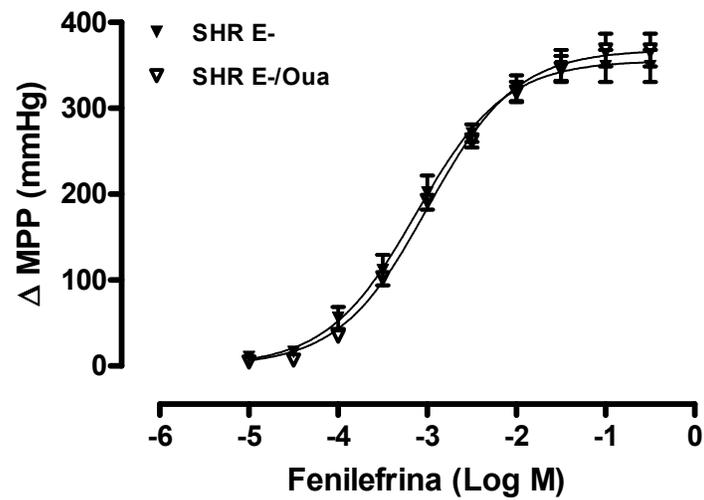
A)



B)



c)



**Figura 9.** Mudanças na média da pressão de perfusão ( $\Delta$ MPP; mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina após lesão endotelial com CHAPS no leito vascular caudal de ratos Wistar (A, n = 7), WKY (B, n = 5) e SHR (B, n = 5), antes (símbolos cheios) e após (símbolos vazios) perfusão por 60 minutos com 1  $\mu$ M de ouabaína.

ANOVA (duas vias):  $P > 0,05$ .

#### **4.2.5. Análise da participação da Angiotensina II nos efeitos da ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina**

Resultados anteriores demonstraram que 1  $\mu$ M de ouabaína foi capaz de aumentar a reatividade vascular à fenilefrina e que essa resposta é dependente da presença do endotélio funcional. Ao mesmo tempo, dados prévios do nosso laboratório (Padilha *et al*, 2004) demonstraram que pequenas doses de ouabaína (1 nM) aumenta a reatividade à fenilefrina em ratos SHR, no mesmo segmento arterial utilizado no presente estudo, e que essa resposta é dependente de angiotensina II endotelial. Dessa forma, analisamos se esse mesmo mecanismo poderia estar implicado nos efeitos de concentrações maiores de ouabaína sobre a reatividade vascular de ratos hipertensos e normotensos, utilizando, para isso, losartan, um inibidor dos receptores AT1 para angiotensina II.

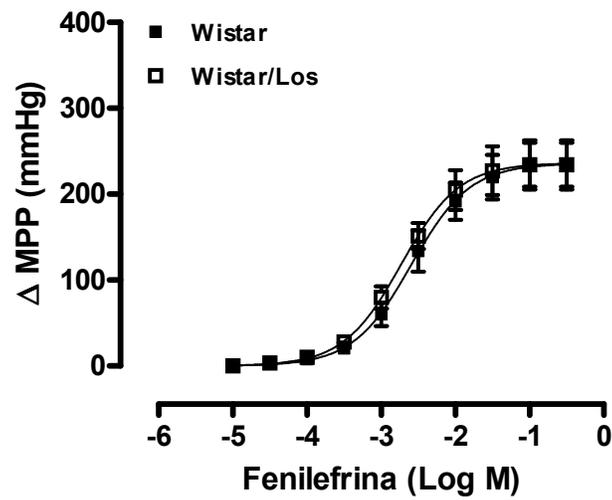
Inicialmente, avaliamos se o losartan *per se* modificava a reatividade vascular à fenilefrina em ratos Wistar e WKY. Uma vez que dados prévios do nosso laboratório (Padilha *et al*, 2004) demonstraram que a resposta vasoconstritora a esse agonista  $\alpha$ -adrenérgico não se alterava em ratos SHR, esse protocolo não foi realizado no presente estudo. Dessa forma, como é possível observar nas figuras 10A e 10 B, o losartan não produziu nenhuma alteração na reatividade vascular à fenilefrina e nos valores de sensibilidade (Wistar:  $0,003 \pm 0,001$  vs Wistar/Los:  $0,002 \pm 0,0004$ ; WKY:  $0,003 \pm 0,001$  vs WKY/Los:  $0,002 \pm 0,0003$ . Teste *T*,  $P > 0,05$ ) e resposta máxima (Wistar:  $231,2 \pm 21,9$  mmHg vs Wistar/Los:  $233,5 \pm 25,6$  mmHg; WKY:  $217,6 \pm 11,6$  mmHg vs WKY/Los:  $229,7 \pm 16,9$  mmHg. Teste *T*,  $P > 0,05$ ) a esse agente vasoconstritor.

Nos animais normotensos, a co-infusão por 60 minutos com ouabaína e losartan (Figura 11), não modificou a sensibilidade (Wistar:  $0,004 \pm 0,002$  vs Wistar Oua/Los:  $0,002 \pm 0,0002$ ; WKY:  $0,002 \pm 0,0003$  vs WKY Oua/Los:  $0,001 \pm 0,0003$ . Teste *T*,  $P > 0,05$ ) e a resposta máxima (Wistar:  $259,8 \pm 15,9$  mmHg vs Wistar Oua/Los:  $252,8 \pm 13,2$  mmHg; WKY:  $227,0 \pm 13,2$  mmHg vs WKY Oua/Los:  $250,1 \pm 16,1$  mmHg. Teste *T*,  $P >$

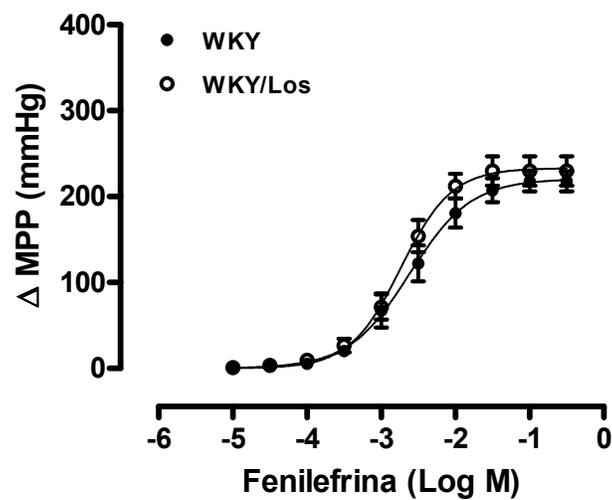
0,05) a fenilefrina, sugerindo que os efeitos desse glicosídeo sobre a reatividade vascular (ver figuras 7A e 7B) são mediados pela angiotensina II.

Já nos SHR, como demonstrado na figura 11C, a perfusão com losartan aboliu somente os efeitos pressores da ouabaína (ver figura 7C) sobre a resposta máxima à fenilefrina (SHR:  $295,5 \pm 11,3$  mmHg vs SHR Oua/Los:  $303,7 \pm 11,2$  mmHg. Teste *T*,  $P > 0,05$ ), mantendo seus efeitos sobre a sensibilidade a esse agente vasoconstritor (SHR:  $0,005 \pm 0,001$  vs SHR Oua/Los:  $0,002 \pm 0,0004$ . Teste *T*,  $P < 0,05$ ).

A)



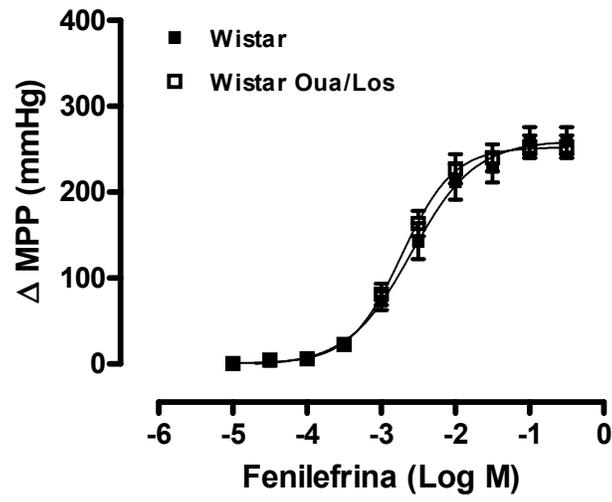
B)



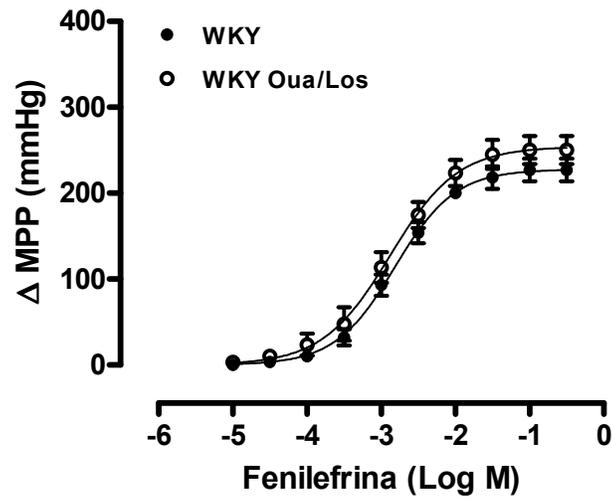
**Figura 10.** Mudanças na média da pressão de perfusão ( $\Delta$ MPP; mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina no leito vascular caudal de ratos Wistar (A, n = 6) e WKY (B, n = 4) antes (símbolos cheios) e após (símbolos vazios) perfusão por 60 minutos com losartan ( $10^{-4}$ M).

ANOVA (duas vias):  $P > 0,05$ .

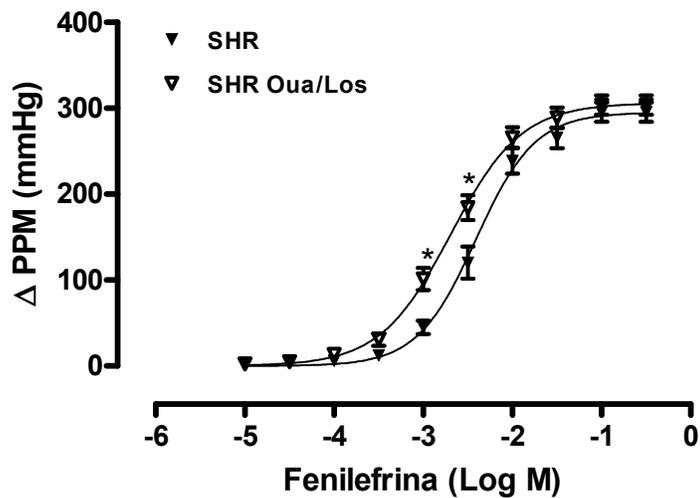
A)



B)



C)



**Figura 11.** Mudanças na média da pressão de perfusão ( $\Delta$ MPP; mmHg) induzidas por doses crescentes de fenilefrina no leito vascular caudal de ratos Wistar (A, n = 7), WKY (B, n = 6) e SHR (C, n = 12) antes (símbolos cheios) e após (símbolos vazios) co-perfusão por 60 minutos com losartan ( $10^{-4}$ M) e ouabaína ( $1 \mu$ M).

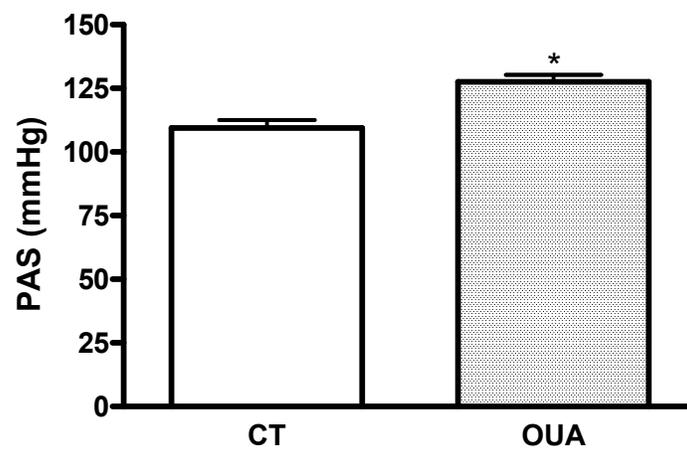
ANOVA (duas vias): \*  $P < 0,05$  vs após co-perfusão com losartan e ouabaína.

### 4.3. Experimentos crônicos

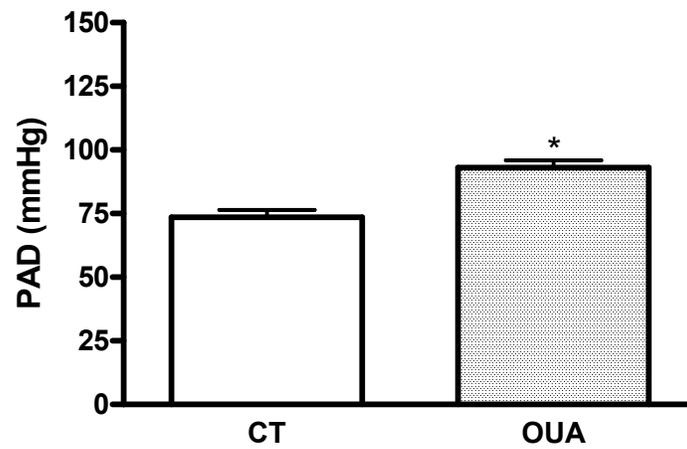
#### 4.3.1. Valores pressóricos, de frequência cardíaca e de massa corporal

O tratamento por 15 dias com ouabaína induziu aumento significativo da pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca quando comparado aos animais controle (Figura 12). Ao final dos 15 dias de tratamento os valores de massa corporal foram similares nos dois grupos estudados (CT:  $351,8 \pm 7,4$  g; OUA15d  $352,3 \pm 4,71$  g. Teste T,  $P > 0,05$ ).

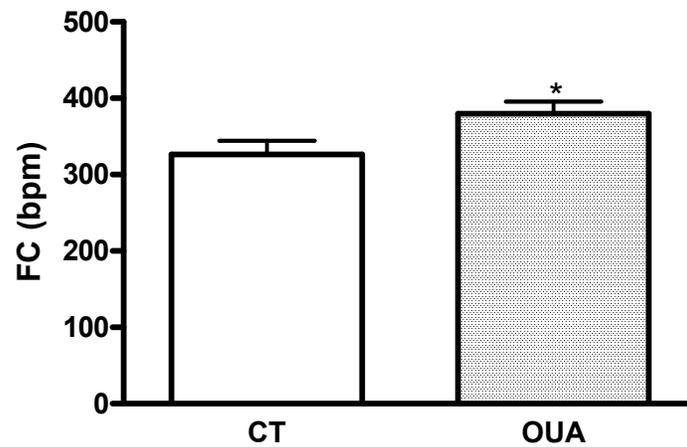
A)



B)



C)



**Figura 12.** Valores de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg), pressão arterial diastólica (PAD, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de ratos Wistar controle (CT, n = 10) e tratados por 15 dias com ouabaína (OUA, n = 10). Teste T: \* P < 0,05 vs CT.

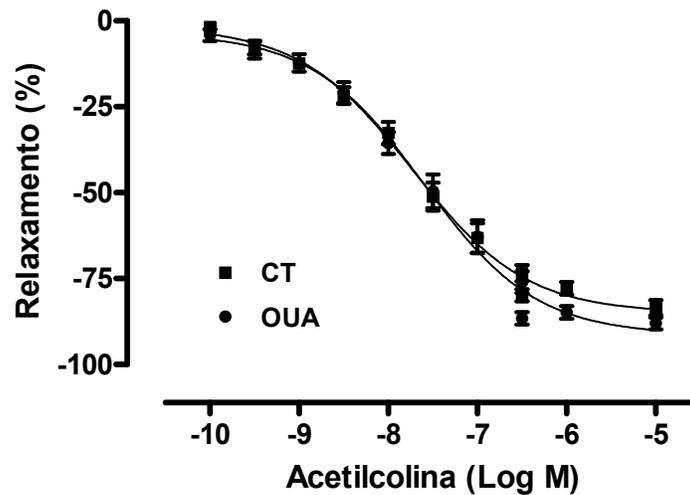
#### **4.3.2. Respostas vasculares ao KCl, a acetilcolina e à fenilefrina**

O diâmetro luminal efetivo das artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos tratados com ouabaína não diferiram quando comparado ao grupo controle (CT:  $218 \pm 6,3 \mu\text{m}$  vs OUA:  $212 \pm 6,7 \mu\text{m}$ , Teste *T*,  $P > 0,05$ ).

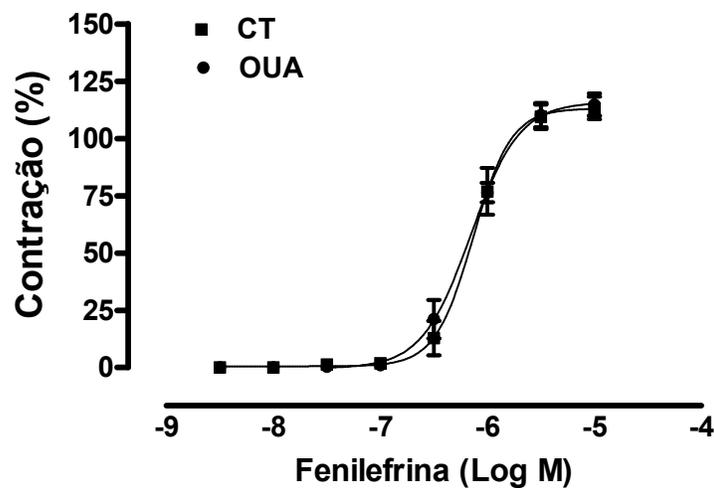
As contrações induzidas por KCl (120 mM) foram similares em artérias mesentéricas de ratos tratados com ouabaína e ratos controle (CT:  $6,83 \pm 0,71 \text{ mN/mm}$  vs OUA:  $5,26 \pm 0,36 \text{ mN/mm}$ ; Teste *T*,  $P > 0,05$ ). A retirada mecânica do endotélio não alterou a resposta contrátil induzida pelo KCl tanto nos ratos controle (CT/E+:  $6,83 \pm 0,71 \text{ mN/mm}$  vs CT/E-:  $5,4 \pm 0,79 \text{ mN/mm}$ , Teste *T*,  $P > 0,05$ ) como nos ratos ouabaína (OUA/E+:  $5,26 \pm 0,36 \text{ mN/mm}$  vs OUA/E-:  $4,3 \pm 0,8 \text{ mN/mm}$ , Teste *T*,  $P > 0,05$ ). Da mesma forma, nos segmentos sem endotélio, a resposta ao KCl não diferiu entre os grupos experimentais (CT/E-:  $5,4 \pm 0,79 \text{ mN/mm}$  vs OUA/E-:  $4,3 \pm 0,8 \text{ mN/mm}$ , Teste *T*,  $P > 0,05$ ).

Como observado na figura 13, a acetilcolina induziu relaxamento concentração-dependente em artérias mesentéricas de ratos controle e ouabaína, previamente contraídas com fenilefrina. Tanto a resposta máxima como a sensibilidade a esse agente vasodilatador não foram alteradas pelo tratamento com ouabaína (EC50: CT:  $2,35 \times 10^{-8} \pm 4,89 \times 10^{-9}$ ; OUA:  $5,7 \times 10^{-8} \pm 2,12 \times 10^{-8}$ . Rmax: CT:  $-84,90 \pm 2,1$ ; OUA:  $-86,92 \pm 2,70$ .  $P > 0,05$ ).

A administração de fenilefrina promoveu, de maneira concentração-dependente, aumento do tônus basal de artérias mesentéricas de animais controle e ouabaína (Figura 14). Nestes grupos, tanto a resposta máxima como a sensibilidade a este agonista alfa-1 adrenérgico foram de similar magnitude (Figura 14 e Tabela 6).



**Figura 13.** Relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$ M) em artérias mesentéricas de resistência pré-contraídas com fenilefrina em ratos controle (CT, n = 11) e tratados com ouabaína (OUA, n = 9). Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por fenilefrina. ANOVA (duas vias):  $P > 0,05$ .



**Figura 14.** Respostas contráteis induzidas por fenilefrina, em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 8) e Ouabaína (OUA, n = 7). Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA (duas vias):  $P > 0,05$ .

**Tabela 6.** Efeito da remoção do endotélio (E-) e dos tratamentos com Captopril (CAP), Losartan (LOS) e L-NAME (LNA) na Rmax (%) e EC50 à fenilefrina em artéria mesentérica de ratos controle (CT) e tratados por 15 dias com ouabaina (OUA).

	EC50	R <sub>max</sub> (%)
<b>E+</b>		
CT (8)	$7,97 \times 10^{-7} \pm 9,72 \times 10^{-8}$	113,3 ± 4,95
OUA (7)	$7,03 \times 10^{-7} \pm 6,37 \times 10^{-8}$	114,79 ± 4,85
<b>E-</b>		
CT (7)	$4,34,10^{-7} \pm 7,44 \times 10^{-8} *$	126,64 ± 7.45
OUA (7)	$4,61 \times 10^{-7} \pm 3,46 \times 10^{-8} *$	129,45 ± 3,68*
<b>CAP</b>		
CT (6)	$1,09 \times 10^{-6} \pm 3,45 \times 10^{-7}$	109,89 ± 3,82
CT/CAP (6)	$1,11 \times 10^{-6} \pm 2,32 \times 10^{-7}$	112,77 ± 3,70
OUA (7)	$4,91 \times 10^{-7} \pm 8,19 \times 10^{-8}$	130,56 ± 4,16
OUA/CAP (7)	$3,80 \times 10^{-7} \pm 4,84 \times 10^{-8}$	132,03 ± 3,97
<b>LOS</b>		
CT (7)	$7,20 \times 10^{-7} \pm 1,30 \times 10^{-7}$	113,24 ± 4,13
CT/LOS (7)	$6,46 \times 10^{-7} \pm 1,10 \times 10^{-7}$	117,46 ± 4,22
OUA (7)	$4,49 \times 10^{-7} \pm 9,57 \times 10^{-8}$	132,69 ± 5,48
OUA/LOS (7)	$3,97 \times 10^{-7} \pm 1,18 \times 10^{-7}$	132,62 ± 3,21
<b>LNA</b>		
CT (9)	$1,00 \times 10^{-6} \pm 1,61 \times 10^{-7}$	118,76 ± 4,46
CT/LNA (9)	$5,52 \times 10^{-7} \pm 1,36 \times 10^{-7} +$	119,36 ± 3,10
OUA (7)	$6,56 \times 10^{-7} \pm 2,11 \times 10^{-7}$	136,67 ± 2,67
OUA/LNA (7)	$1,63 \times 10^{-7} \pm 8,14 \times 10^{-8} +$	137,54 ± 1,86

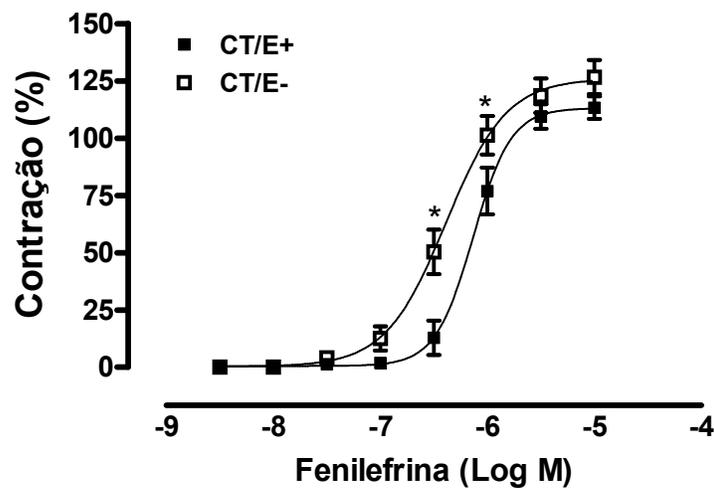
Os valores estão expressos como média ± epm. Teste T.

\* P < 0,05 vs E+. + P < 0,05 CT/LNA e OUA/LNA vs CT e OUA, respectivamente.

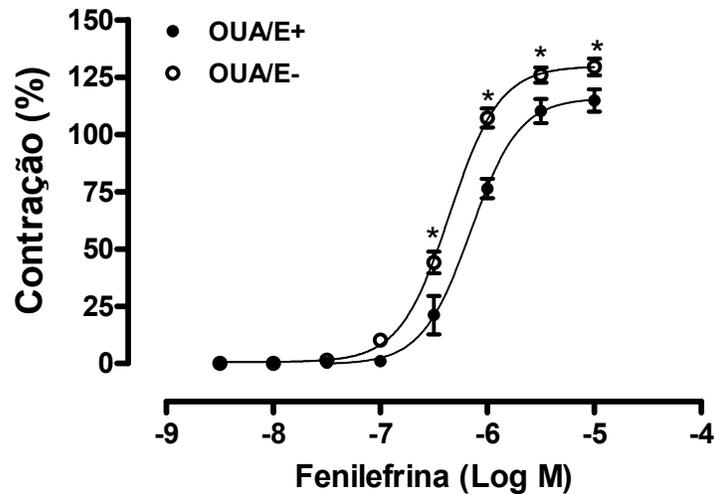
#### 4.3.3. Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Tanto nos ratos controle como nos ratos tratados com a ouabaína, a remoção do endotélio aumentou à sensibilidade da resposta contrátil à fenilefrina, embora o aumento da resposta máxima só tenha sido evidenciada nos ratos ouabaína (Figura 15A e 15B, tabela 6). Através do cálculo da razão entre a sensibilidade à fenilefrina em condições com endotélio e sem endotélio no grupo controle e entre as mesmas condições no grupo ouabaína, observou-se que o efeito da remoção do endotélio não foi diferente entre um grupo ou outro (CTE+/E-:  $0,69 \pm 0,23$  vs OUA E+/E-:  $0,71 \pm 0,09$ . Teste T,  $P > 0,05$ ).

A)



B)

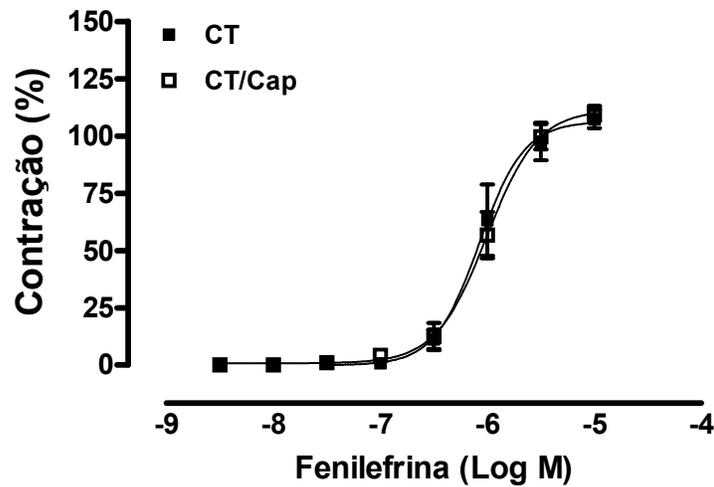


**Figura 15.** Efeito da remoção mecânica do endotélio (E-) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 8 - 7) e tratados por 15 dias com ouabaína (OUA, n = 7 - 7). Os resultados (média  $\pm$  epm) são expressos como porcentagem da resposta máxima ao KCl. ANOVA (duas vias). \* P < 0,05.

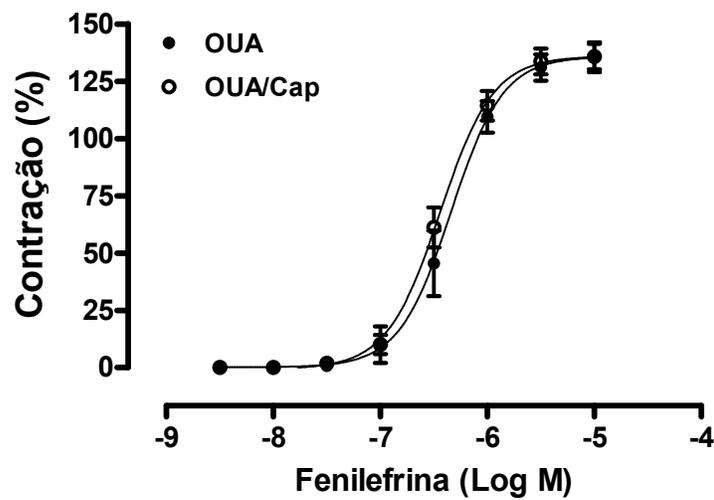
#### **4.3.4. Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina e dos receptores AT1 na resposta vasoconstritora à fenilefrina**

Para avaliar a contribuição da angiotensina II nas respostas alfa adrenérgicas, curvas concentração-resposta à fenilefrina foram construídas antes e após incubação dos segmentos arteriais com captopril ( $10^{-4}$ M), um inibidor da enzima conversora de angiotensina, e losartan ( $10^{-4}$ M), um inibidor dos receptores AT1 para angiotensina II. Tanto nos ratos controle, como nos ratos ouabaína, a incubação com essas drogas não modificou a sensibilidade e a resposta máxima à fenilefrina (Figura 16 e 17, tabela 6).

A)

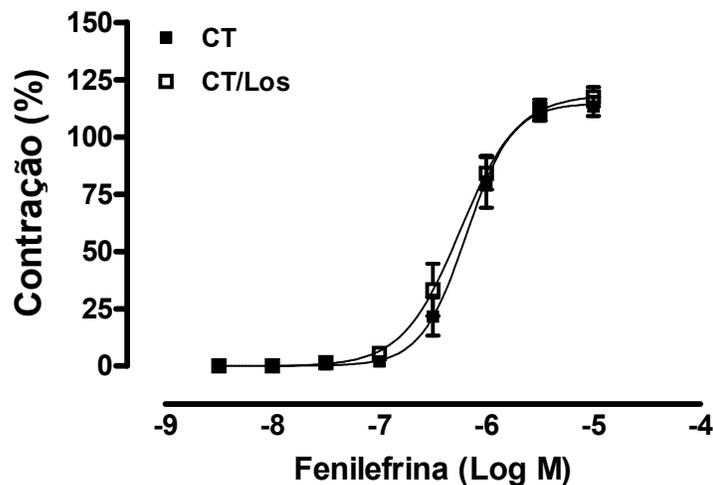


B)

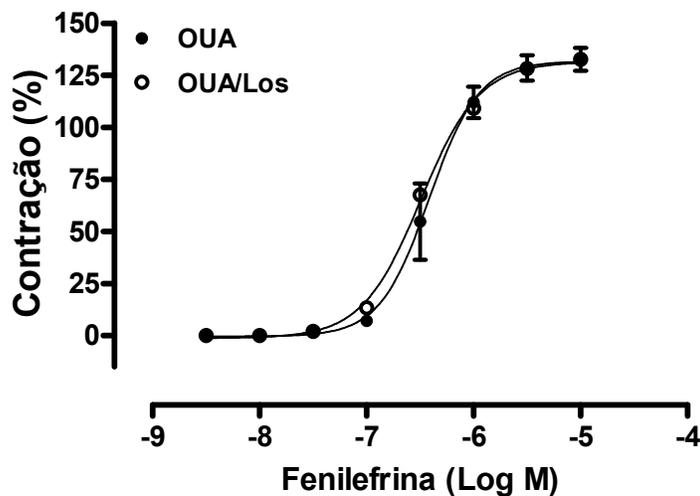


**Figura 16.** Resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 6) e tratados por 15 dias com ouabaina (OUA, n = 7) antes e após incubação com captopril (Cap, 10  $\mu$ M). Os resultados (média  $\pm$  epm) são expressos como porcentagem da resposta máxima ao KCl. ANOVA (duas vias).  $P > 0,05$ .

A)



B)



**Figura 17.** Resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 7) e tratados por 15 dias com ouabaina (OUA, n = 7) antes e após incubação com Losartan (Los, 10  $\mu$ M). Os resultados (média  $\pm$  epm) são expressos como porcentagem da resposta máxima ao KCl. ANOVA (duas vias). P > 0,05.

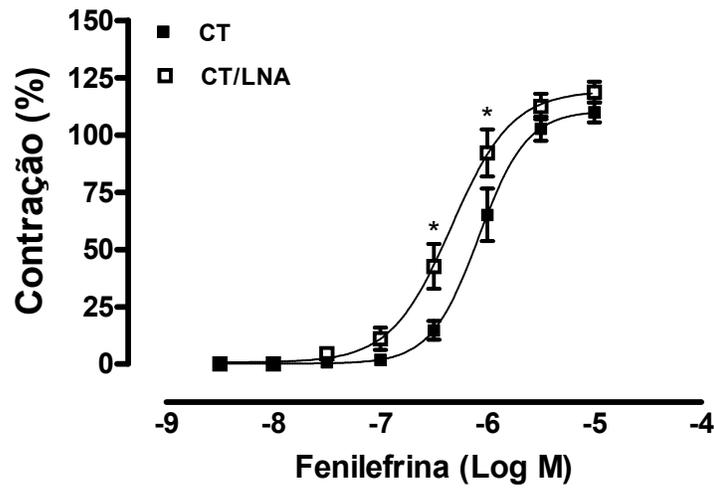
#### **4.3.5. Efeito da inibição da NOS na resposta vasoconstritora à fenilefrina**

Com o objetivo de avaliar o papel do óxido nítrico sobre as curvas concentração-resposta à fenilefrina, artérias mesentéricas de resistência de ratos controle e ouabaína foram pré-incubadas com um inibidor não-seletivo da sintase de óxido nítrico, o L-NAME ( $10^{-5}$ M).

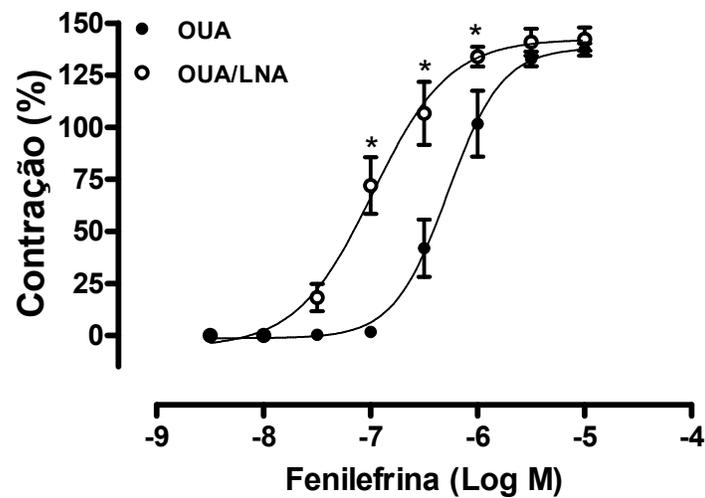
Como demonstrado na Figura 18 e tabela 6, o L-NAME potencializou a resposta vasoconstritora à fenilefrina nos dois grupos estudados. No entanto, a potencialização da resposta  $\alpha$ -adrenérgica induzida por esse fármaco, avaliada através da razão entre a sensibilidade à fenilefrina na presença e ausência da droga nos dois grupos, foi maior nos animais tratados com ouabaína (CT-CT/LNA:  $0,63 \pm 0,16$ ; OUA-OUA/LNA:  $0,22 \pm 0,04$ . Teste T,  $P < 0,05$ ).

Ao compararmos o efeito da remoção do endotélio com o efeito obtido pela pré-incubação com L-NAME sobre as curvas concentração-resposta à fenilefrina, através da razão da sensibilidade a esse fármaco obtida nos dois casos acima, observamos que em segmentos de ratos controle a potencialização da resposta à fenilefrina após remoção endotelial ou tratamento com L-NAME (CT E+/E-:  $0,69 \pm 0,23$  vs CT-CT/LNA:  $0,63 \pm 0,16$ . Teste T,  $P > 0,05$ ) foi similar. Já nos animais ouabaína, a razão da sensibilidade à fenilefrina obtida antes e após a remoção do endotélio foi maior comparada àquela obtida antes e após incubação com L-NAME (OUA E+/E-:  $0,71 \pm 0,09$  vs OUA-OUA/LNA:  $0,22 \pm 0,04$ . Teste T,  $P < 0,05$ ).

A)



B)



**Figura 18.** Resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 9) e tratados por 15 dias com ouabaína (OUA, n = 7) antes e após incubação com L-NAME (LNA, 100  $\mu$ M). Os resultados (média  $\pm$  epm) são expressos como porcentagem da resposta máxima ao KCl. ANOVA (duas vias). \* P < 0,05 vs após incubação com LNA.

#### **4.3.6. Efeito da inibição da COX na resposta vasoconstritora à fenilefrina**

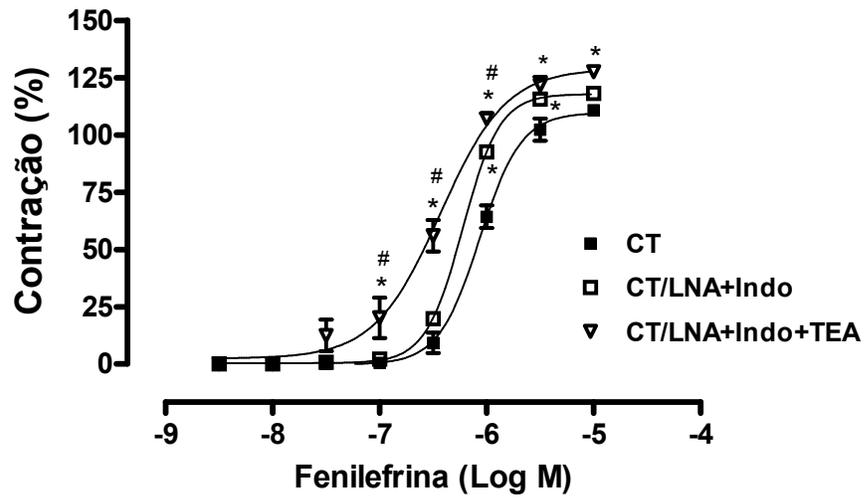
Para avaliar a participação dos prostanóides na resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina antes e após incubação com L-NAME ( $10^{-5}$ M) e Indometacina ( $10^{-4}$ M). No mesmo protocolo, averiguamos a participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio através da realização de uma terceira curva concentração-resposta à fenilefrina previamente incubada com L-NAME ( $10^{-5}$ M), Indometacina ( $10^{-4}$ M) e TEA (2mM).

A incubação das artérias com L-NAME e Indometacina aumentou a sensibilidade à fenilefrina nos ratos controle (Figura 19A e tabela 7). Entretanto, nos animais ouabaína (Figura 19B e tabela 7), nenhum efeito foi observado.

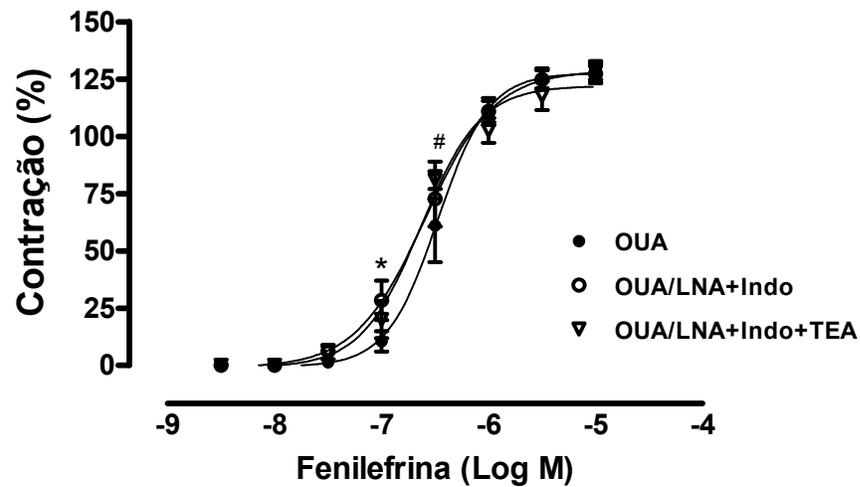
A adição de TEA (2mM), juntamente com L-NAME e Indometacina, produziu um desvio adicional à esquerda nas curvas de fenilefrina nos ratos controle (Figura 19A e tabela 7). Novamente, nos ratos tratados com ouabaína não foi observado mudanças após incubação com esses fármacos (Figura 19B e tabela 7).

Para demonstrar a participação dos prostanóides nas curvas concentração-resposta à fenilefrina, foi calculada a razão da sensibilidade obtida através das curvas de fenilefrina na ausência e presença de L-NAME (Figura 18, tabela 6) e foi comparada essa razão com aquela obtida nas curvas de fenilefrina na ausência e presença de L-NAME e Indometacina (Figura 19, tabela 7). De acordo com essa análise, a presença de indometacina não modificou a sensibilidade nas curvas de fenilefrina nos animais controle (CT-CT/LNA:  $0,63 \pm 0,16$  vs CT-CT/LNA+INDO:  $0,70 \pm 0,05$ . Teste *T*,  $P > 0,05$ ). No entanto, nos animais ouabaína, a presença de indometacina juntamente com L-NAME, reduziu consideravelmente a sensibilidade a fenilefrina obtida das curvas apenas com L-NAME sugerindo a participação dos prostanóides nesse grupo de animais (OUA-OUA/LNA:  $0,22 \pm 0,04$  vs OUA-OUA/LNA+INDO:  $0,74 \pm 0,08$ . Teste *T*,  $P < 0,05$ ).

A)



B)



**Figura 19.** Efeito da pré-incubação com L-NAME (LNA, 100 $\mu$ M) e Indometacina (Indo, 10 $\mu$ M) e com L-NAME (LNA, 100 $\mu$ M), Indometacina (Indo, 10 $\mu$ M) e TEA (2mM) nas curvas concentração-resposta à fenilefrina em artéria mesentérica de ratos controle (CT, n = 6) e tratados por 15 dias com ouabaína (OUA, n = 6). Os resultados (média  $\pm$  epm) são expressos como porcentagem da resposta máxima ao KCl. ANOVA (duas vias). \* P < 0,05 vs incubação com LNA e Indo. # P < 0,05 vs incubação com LNA, Indo e TEA.

**Tabela 7.** Efeito da incubação com tetraetilamônio (TEA, 2 mM) sobre os valores de EC50 e R<sub>max</sub> à fenilefrina em artérias mesentéricas previamente incubadas com L-NAME (LNA, 100 μM) + indometacina (Indo, 10 μM), de ratos controle (CT) e tratados com ouabaína (OUA).

	CT		L-NAME + Indo		L-NAME+Indo+TEA	
	EC50	R <sub>max</sub>	EC50	R <sub>max</sub>	EC50	R <sub>max</sub>
<b>CT</b>	8,93x10 <sup>-7</sup> ± 7,72x10 <sup>-8</sup>	116,17 ± 5,28	6,10x10 <sup>-7</sup> ± 2,05x10 <sup>-8</sup> *	122,17 ± 3,84	3,46x10 <sup>-7</sup> ± 5,45x10 <sup>-8</sup> *+	127,41 ± 2,32
<b>OUA</b>	3,88x10 <sup>-7</sup> ± 9,41x10 <sup>-8</sup>	128,24 ± 4,60	2,76x10 <sup>-7</sup> ± 7,26x10 <sup>-8</sup>	127,34 ± 4,21	1,04x10 <sup>-6</sup> ± 7,95x10 <sup>-7</sup>	128,18 ± 3,43

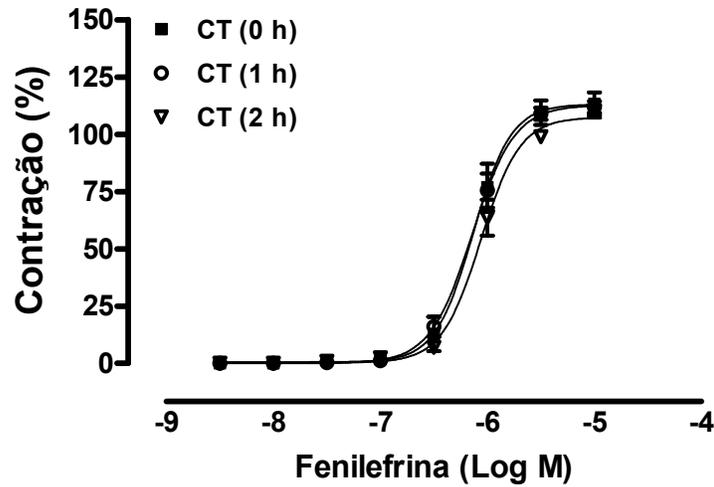
Valores representam média ± erro padrão da média.

ANOVA: \* P < 0,05 vs CT; +P < 0,05 vs L-NAME + Indo.

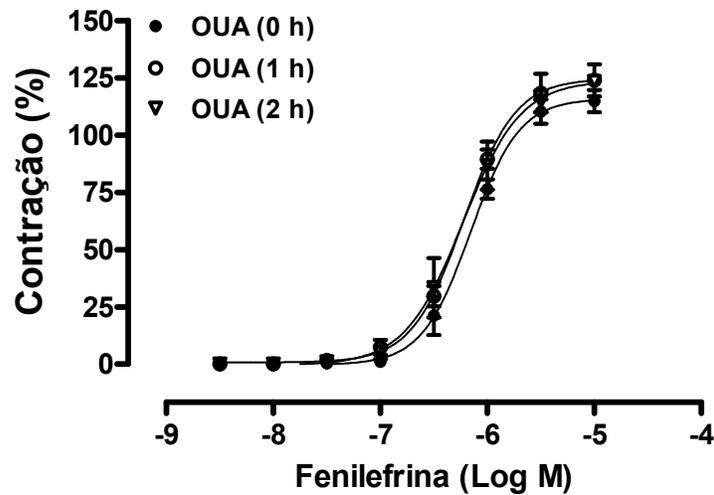
#### **4.3.7. Efeito temporal da resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina**

Para verificar a estabilidade das preparações foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos controle e ouabaína, uma e duas horas após realização da primeira curva à fenilefrina (0h). Sendo assim, como observado na figura 20 e tabela 8, tanto nos animais controle como nos animais ouabaína, a sensibilidade e a resposta máxima a este agonista alfa-adrenérgico não sofreram modificações ao longo do protocolo experimental.

A)



B)



**Figura 20.** Controle temporal das curvas concentração-resposta à fenilefrina artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 8) e ouabaína (OUA, n = 7). Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl.

ANOVA:  $P > 0,05$ .

**Tabela 8.** Valores de resposta máxima ( $R_{max}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) à noradrenalina uma e duas horas após realização da primeira curva concentração-resposta a este agonista alfa-adrenérgico em artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle, Ouabaína, Losartan e Ouabaína + Losartan.

	0 Hora		1 Hora		2 Horas	
	EC50	$R_{max}$	EC50	$R_{max}$	EC50	$R_{max}$
<b>CT</b>	$7,97 \times 10^{-7} \pm$	$113,3 \pm 4,95$	$7,53 \times 10^{-7} \pm$	$111,8 \pm 2,52$	$9,12 \times 10^{-7} \pm$	$110,0 \pm 2,66$
	$9,72 \times 10^{-8}$		$7,45 \times 10^{-8} *$		$1,13 \times 10^{-8} *+$	
<b>OUA</b>	$7,22 \times 10^{-7} \pm$	$114,8 \pm 4,85$	$5,93 \times 10^{-7} \pm$	$126,3 \pm 5,39$	$7,04 \times 10^{-6} \pm$	$123,4 \pm 2,16$
	$7,19 \times 10^{-8}$		$5,42 \times 10^{-8}$		$1,90 \times 10^{-8}$	

Valores representam média  $\pm$  erro padrão da média.

ANOVA:  $P > 0,05$ .

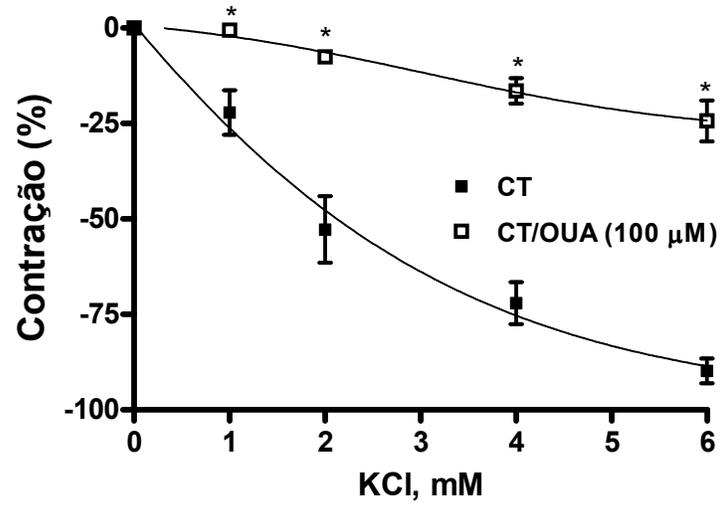
#### **4.3.8. Efeito do tratamento crônico com ouabaína sobre a atividade funcional da $Na^+$ , $K^+$ -ATPase sensível à ouabaína**

A atividade funcional da  $Na^+K^+$ ATPase foi estudada indiretamente através da técnica de relaxamento induzido pelo potássio descrita por Webb & Bohr (1978) e modificada por Rossoni e colaboradores (1999).

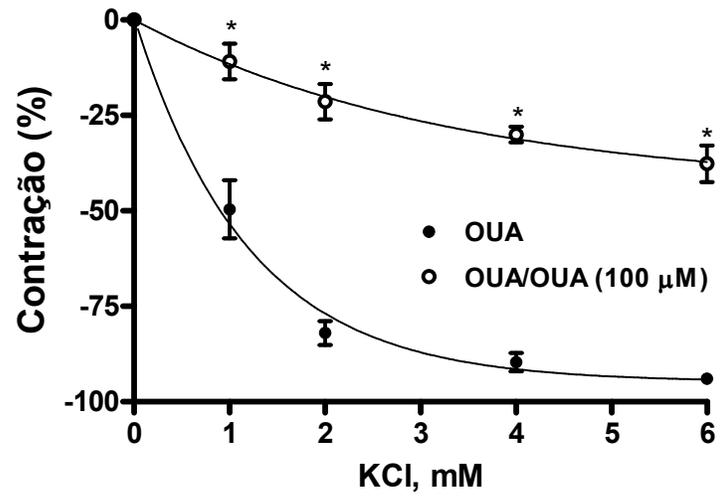
Como observado na figura 21, o potássio administrado às preparações foi capaz de reduzir de maneira concentração-dependente a contração induzida por fenilefrina ( $10^{-6}M$ ) em artéria mesentérica de ratos controle (Figura 21A) e tratados com ouabaína (Figura 21B). A administração de ouabaína  $100 \mu M$  inibiu de maneira significativa o relaxamento induzido pelo potássio nos dois grupos de animais estudados.

Comparando-se a dAUC da curva de relaxamento ao KCl na presença e na ausência de ouabaína ( $100 \mu M$ ) (Figura 21C), é possível observar que essa diferença foi similar nos dois grupos, sugerindo que a atividade funcional da  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase sensível à ouabaína não difere pelo tratamento por 15 dias com ouabaína.

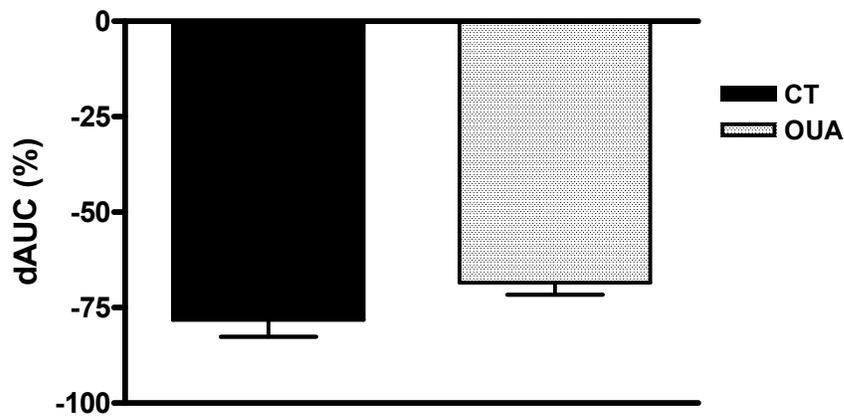
A)



B)



c)



**Figura 21.** A. Curva de relaxamento ao KCl na ausência e na presença de ouabaína (OUA 100  $\mu$ M) em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle (CT, n = 5) e ouabaína (OUA, n = 5).

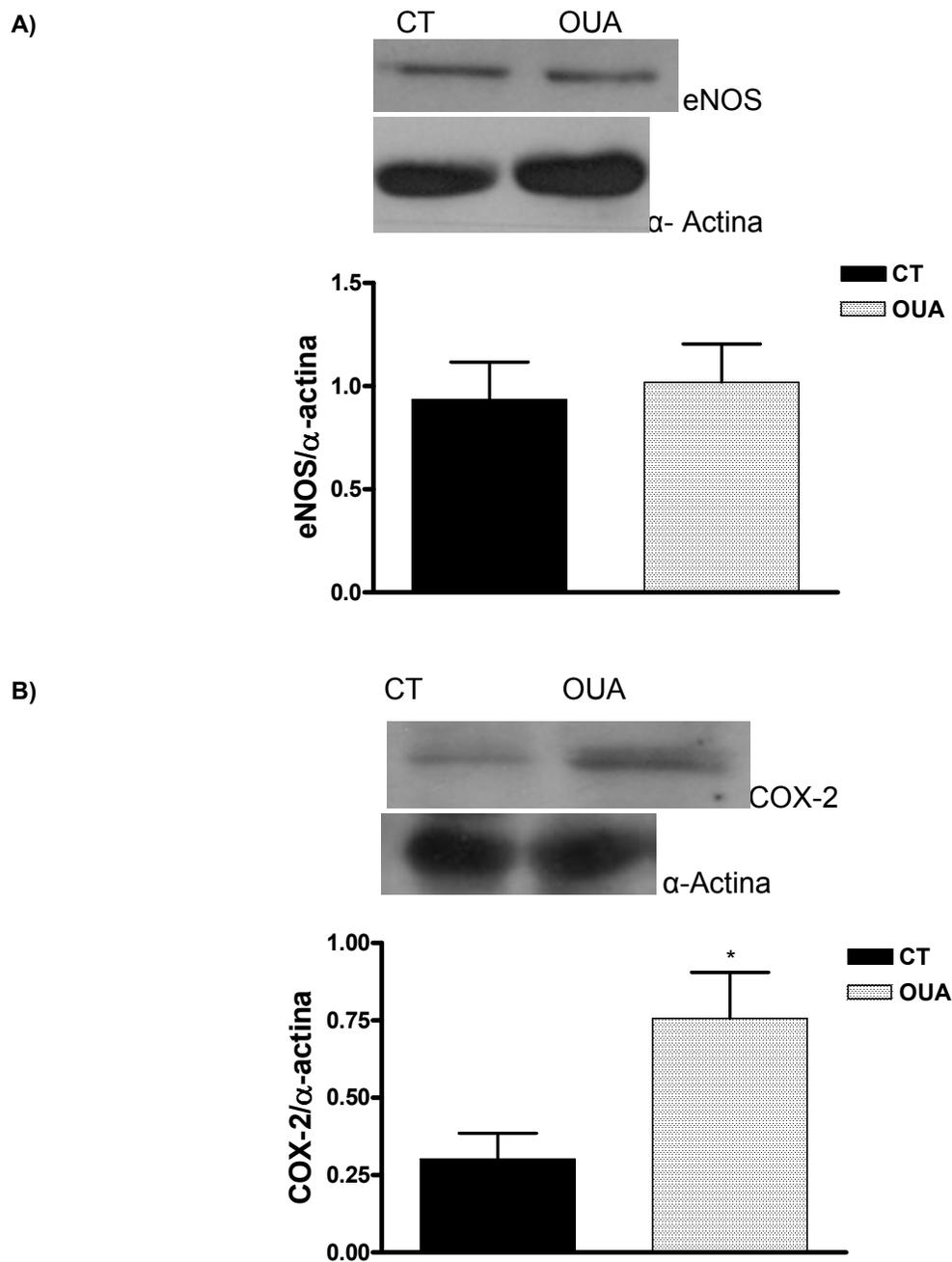
ANOVA: \* P < 0,05 CT ou OUA vs após incubação com ouabaína 100  $\mu$ M.

Figura C representa a diferença de área abaixo da curva (dAUC) do relaxamento ao KCl na ausência e presença de ouabaína.

Teste T: P > 0,05.

#### 4.3.9. Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico e da COX-2

A Figura 22 mostra a expressão da isoforma eNOS (Figura 22A) e COX-2 (Figura 22B) detectadas pelo método de Western blot em artérias mesentéricas de ratos controle e ouabaína. A expressão protéica para a isoforma eNOS não foi alterada pelo tratamento com ouabaína. No entanto, o tratamento com ouabaína foi capaz de aumentar a expressão de COX-2, quando comparado às artérias de animais controle.



**Figura 22.** (A) Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e (B) Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica da COX-2 em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle e ouabaína. Painel superior mostra as bandas de *Western blots* representativas da expressão da eNOS e  $\alpha$ -actina, e da COX-2 e  $\alpha$ -actina em artérias mesentéricas de ratos controle e ouabaína. Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como expressão da eNOS em relação a  $\alpha$ -actina. Teste T: \* P < 0,05 vs CT.

## **DISCUSSÃO**

## 5. Discussão

A ouabaína é um composto endógeno presente em concentrações nanomolares no plasma de diversos mamíferos, incluindo o homem (Hamlyn *et al*, 1996). Os níveis plasmáticos dessa substância estão elevados em algumas condições patológicas, tais como hipertensão arterial, podendo contribuir para a gênese e/ou manutenção das mesmas (Hamlyn *et al*, 1982; Gottlieb *et al*, 1992). O envolvimento da ouabaína nos processos hipertensivos vem sendo sugerido desde a década de 70 por Haddy & Overbeck (1976). Esses pesquisadores demonstraram que esse hormônio inibidor da atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase participava da gênese de hipertensões dependentes de volume.

Este composto, inicialmente foi denominado de fator *digitalis-like* (Haddy *et al*, 1978). No entanto, por possuir características semelhantes à ouabaína foi denominado posteriormente de fator *ouabain-like* (Mathews *et al*, 1991; Bova *et al*, 1991). Hoje, esse fator já é conhecido como ouabaína endógena e sua produção e secreção são feitas por regiões específicas do organismo, como o hipotálamo, região anteroventral do terceiro ventrículo, córtex adrenal e miócitos cardíacos (Hauptert & Sancho, 1979; Songu-Mize *et al*, 1982; Tamura *et al*, 1988; D'Urso *et al*, 2004).

Diversos estudos experimentais, tanto crônicos como agudos, têm sido desenvolvidos no intuito de elucidar os mecanismos de ação da ouabaína devidos, principalmente, ao seu efeito hipertensinogênico. Assim, a proposta deste trabalho foi o de desenvolver dois estudos paralelos, um agudo e outro crônico, de forma a contribuir para o conhecimento dos efeitos hipertensores desse hormônio.

### 5.1. Estudos agudos

Trabalhos anteriores do nosso grupo, utilizando concentrações nanomolares de ouabaína, demonstraram que essa substância, além de aumentar a pressão arterial de ratos hipertensos, potencializa as respostas vasoconstritoras a agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (Songu-Mize *et al*, 1995; Vassallo *et al*, 1997; Rossoni *et al*, 2001; Padilha *et al*, 2004). Além disso, Rossoni e colaboradores (1999) verificaram que em artéria

caudal de ratos normotensos, 10 nM de ouabaína além de promover aumento de reatividade vascular à fenilefrina, estimulava a liberação de um fator endotelial que era capaz de modular negativamente o endotélio. No entanto, recentemente outro trabalho do nosso grupo (Padilha *et al*, 2004), utilizando concentrações ainda mais baixas de ouabaína, verificou um aumento de reatividade vascular à fenilefrina apenas em artéria caudal de ratos espontaneamente hipertensos, demonstrando que ratos hipertensos são mais sensíveis às ações da ouabaína do que àqueles normotensos. Nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que o aumento da responsividade ao agonista  $\alpha$ -adrenérgico pela ouabaína era atribuído à estimulação da ECA e liberação de angiotensina II local. Esses dados sugerem que os efeitos de baixas concentrações de ouabaína são distintos em presença de hipertensão arterial, e poderiam colaborar para a gênese e/ou manutenção da mesma.

No presente trabalho, buscamos verificar se concentrações maiores de ouabaína poderiam alterar a reatividade vascular e a pressão arterial de ratos hipertensos (SHR) e normotensos (Wistar e WKY) pelos mesmos mecanismos encontrados no trabalho de Padilha e colaboradores (2004).

#### **5.1.1. Efeito da ouabaína na pressão arterial de ratos anestesiados**

Neste estudo, foram utilizados ratos hipertensos SHR, e normotensos WKY e Wistar. Todos os animais tinham, aproximadamente, três meses de idade e não apresentaram diferenças na massa corporal.

Com relação à frequência cardíaca de animais anestesiados, os valores não diferiram entre os ratos Wistar e SHR, embora tenham sido diferentes quando comparados os ratos WKY e SHR. De acordo com Dickhout & Lee (1998), a frequência cardíaca pode se apresentar mais elevada em SHR quando comparado ao WKY, embora Smith & Hutchins (1979), verificaram que apenas nas primeiras semanas de vida é que a frequência cardíaca se torna diferente entre esses animais. No entanto, vale ressaltar que os ratos do presente estudo encontravam-se sob condições anestésicas, que poderia interferir sobre esse parâmetro.

Quanto aos níveis pressóricos, como era de se esperar, apresentaram-se mais elevados em ratos SHR quando comparados tanto aos ratos WKY como aos Wistar. Entretanto, o anestésico reduziu de maneira similar, a pressão arterial sistólica e diastólica nos 3 grupos estudados (comparar tabela 1 e tabela 2), conforme já descrito na literatura (Vassallo *et al*, 1997; Rossoni *et al*, 2001; Rossoni *et al*, 2003).

A hipertensão arterial nos ratos SHR começa a se desenvolver a partir da quinta semana de vida (Lais *et al*, 1977). O desenvolvimento dessa hipertensão depende em parte de alterações estruturais na parede dos vasos sanguíneos que precedem ao desenvolvimento da mesma (Lee 1985; Smeda *et al*, 1988; Rizzoni *et al*, 1994; van Gorp *et al*, 2000). Além disso, alguns trabalhos na literatura têm demonstrado que na fase pré-hipertensiva, a atividade simpática já se encontra aumentada, sendo este um fator que, adicionado às alterações estruturais dos vasos sanguíneos, podem constituir-se nas alterações básicas predisponentes à hipertensão arterial nos SHR (Tucker & Johnson, 1984; Brock *et al*, 1996).

Para avaliar os efeitos da ouabaína sobre a pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos, 18 µg/Kg (~30 nmol/Kg) dessa substância foi administrada após um período de estabilização de 30 minutos. Como era de se esperar, essa substância elevou a pressão arterial sistólica e diastólica dos ratos Wistar e SHR, confirmando o seu efeito hipertensor (Vassallo *et al*, 1997; Rossoni *et al*, 2001). No entanto, esse mesmo efeito não foi observado nos animais WKY. Ao contrário, nesses ratos a pressão arterial diastólica foi reduzida pela administração aguda de ouabaína. Trabalhos do nosso grupo ainda não publicados (Siman *et al*, 2007) também verificaram essa mesma resposta, porém utilizando concentrações menores de ouabaína (0,18 µg/Kg).

O incremento da pressão arterial encontrado nos animais Wistar e SHR pode ser explicado por diversos mecanismos, incluindo mecanismos vasculares. Como já mencionado, alterações na resistência vascular periférica podem interferir diretamente na pressão arterial. Trabalhos anteriores já demonstraram que concentrações elevadas de ouabaína podem sensibilizar a resposta vascular a agentes  $\alpha$ -adrenérgicos e ao KCl (Overbeck, 1984; Ceron & Bendhack, 1997; Vassallo *et al*, 1997; Rossoni *et al*, 2001).

Isso poderia explicar, principalmente, o efeito da ouabaína sobre o aumento da pressão diastólica.

A isoforma  $\alpha$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ , ATPase consiste de 4 diferentes isoformas, com diferentes afinidades para digitálicos (Sweadner, 1989; Marin & Redondo, 1999). Blautein e colaboradores (1998) descreveram um microdomínio celular, denominado de *plasmersome*, onde as isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , que possuem alta afinidade a ouabaína estariam co-localizadas ao trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  e próximas do retículo sarcoplasmático juncional. Nessa região, concentrações nanomolares de ouabaína, inibindo a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase, promoveriam aumento das concentrações de sódio, que por sua vez, inibiria a troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , com conseqüente aumento das concentrações de cálcio, e posterior acúmulo de cálcio no retículo sarcoplasmático. Seguindo esse raciocínio, a concentração utilizada nesse estudo ( $\sim 30$  nmol/Kg) poderia promover aumento da resistência vascular, e assim, aumento da pressão arterial nos ratos Wistar e SHR.

A capacidade da ouabaína de elevar a pressão arterial também resulta de ações centrais. A ouabaína ativa o sistema nervoso simpático e reduz a eficiência do baroreflexo, contribuindo para o aumento da pressão arterial (Leenen *et al*, 1994). Esse efeito está relacionado à capacidade da ouabaína de ativar os sistemas renina-angiotensina e endotelina centrais (Huang & Leenen, 1996b; Huang *et al*, 1998; Di Filippo *et al*, 2003; D'Amico *et al*, 2003). Recentemente, também demonstramos que baixas concentrações de ouabaína promovem liberação local de angiotensina II, aumentando, assim, a sensibilidade do leito vascular caudal à fenilefrina (Padilha *et al*, 2004).

Portanto, para investigar se os efeitos hipertensinogênicos da ouabaína encontrados com a dose utilizada nesse estudo poderiam envolver a angiotensina II, foi realizado o pré-tratamento com losartan, um bloqueador dos receptores AT1 para angiotensina. Nos ratos WKY, a administração de losartan não promoveu efeitos adicionais àqueles observados na presença de ouabaína. No entanto, nos ratos Wistar, esse bloqueador inibiu os efeitos pressores da ouabaína somente sobre a pressão arterial diastólica, sem modificar a pressão arterial sistólica. Provavelmente, nesse caso, o sistema renina-angiotensina periférico parece estar mais envolvido do que o sistema central, já que não observamos o bloqueio na pressão arterial sistólica. No

entanto, vale ressaltar que, para comprovar essa ação protocolos adicionais como, por exemplo, o bloqueio pré-ganglionar, deverão ser realizados futuramente.

Já nos ratos SHR, a administração de losartan não foi capaz de bloquear as ações da ouabaína, tanto sobre a pressão arterial sistólica, quanto sobre a pressão arterial diastólica. O fato do bloqueio dos receptores AT1 não impedirem os efeitos pressóricos da ouabaína tanto nos ratos Wistar quanto nos ratos SHR sugerem outros mecanismos de ação da ouabaína já descritos na literatura. O próprio aumento da atividade simpática causado pela ouabaína poderia ser um fator presente nesses resultados, já que essa substância aumenta a liberação de norepinefrina pelos terminais simpáticos (Rodríguez-Mañas *et al*, 1994). Outro fato é que, agindo como digitálico, a ouabaína pode promover efeito inotrópico positivo, que também contribui para o aumento da pressão arterial (Dostanic *et al*, 2005). Finalmente, não podemos descartar a possibilidade de a ouabaína estar ativando o sistema endotelina, que por sua vez, produz hiperreatividade simpática e, conseqüentemente, aumento da pressão arterial (Di Filippo *et al*, 2003; D'Amico *et al*, 2003).

Uma vez que altas concentrações de ouabaína produzem incremento da pressão arterial diastólica, provavelmente alterações na reatividade vascular podem estar contribuindo para esse efeito hipertensor. Portanto, a próxima etapa desse estudo foi analisar se 1  $\mu$ M de ouabaína modifica a reatividade vascular à fenilefrina no leito vascular caudal de ratos normotensos e hipertensos. Além disso, investigar alguns possíveis mecanismos implicados nessas respostas.

### **5.1.2. Efeito da ouabaína na reatividade vascular *in vitro***

Neste estudo, os animais SHR, como esperado, apresentaram pressão arterial mais elevada do que os normotensos Wistar e WKY. Vale ressaltar que as medidas foram realizadas em animais acordados e por isso, há uma diferença entre os níveis pressóricos apresentados nos protocolos anteriores.

Antes de analisar os efeitos da ouabaína sobre a reatividade vascular à fenilefrina, demonstramos como essa reatividade encontrava-se nos animais

normotensos e hipertensos. De acordo com nossos dados, os ratos WKY apresentaram uma redução de resposta máxima em relação aos Wistar e SHR.

Alguns trabalhos demonstram que a reatividade vascular a agonistas alfa-adrenérgicos pode estar elevada em animais SHR quando comparados aos WKY (Lograno *et al*, 1989; Vulpis *et al*, 1989). No entanto, não encontramos diferenças entre os ratos Wistar e SHR. Tanto os ratos Wistar quanto os WKY, embora normotensos, são geneticamente diferentes, e este fato poderia explicar, em parte, as diferenças na reatividade vascular à fenilefrina.

Os resultados obtidos após a administração de ouabaína demonstram que 1  $\mu\text{M}$  desse digitálico foi capaz de potencializar a resposta vasoconstritora à fenilefrina nos ratos Wistar, WKY e SHR, corroborando dados prévios do nosso laboratório (Vassallo *et al*, 1997; Rossoni *et al*, 2001). Como dito anteriormente, baixas concentrações de ouabaína podem exercer esse efeito sensibilizador através da sua ligação às isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase, na região do plasmersoma (Blaustein *et al*, 1998). No entanto, diferentemente dos resultados obtidos com 10 nM, onde a perfusão com ouabaína reduzia a pressão de perfusão média basal (Rossoni *et al*, 2001), a concentração desse digitálico utilizada neste estudo não promoveu alterações nesse parâmetro nos ratos Wistar e WKY, ao passo que nos SHR, a pressão de perfusão média basal foi elevada. Provavelmente, esse aumento de tônus basal pode ter sido consequência de alterações no potencial de repouso de membrana através da capacidade da ouabaína de inibir a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase (Marin & Redondo, 1999). Esses resultados sustentam a hipótese de que animais hipertensos são mais sensíveis às ações da ouabaína do que os normotensos (Padilha *et al*, 2004). Como o principal receptor para ouabaína é a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase, quanto maior quantidade de sítios receptores, maior será a ação da ouabaína. De fato, alguns estudos, como o de David-Dufilho e colaboradores (1984) e Webb & Bohr (1979) demonstraram que a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase é maior em ratos SHR do que em relação ao seu controle WKY, indicando que a hipertensão repercute com aumento do número de unidades da bomba de sódio na membrana.

Com o intuito de investigar a modulação endotelial na resposta pressora à fenilefrina, o endotélio vascular desses animais foi lesado por administração de uma única dose de CHAPS, como descrito previamente por Rossoni e colaboradores (1999) para o leito vascular caudal. Na ausência do endotélio funcional, a resposta pressora à fenilefrina foi amplificada em todos os grupos estudados. No entanto, nos animais WKY e SHR, além de promover aumento da sensibilidade, houve também aumento de resposta máxima a esse agonista  $\alpha$ -adrenérgico, sugerindo que, nesses animais, a modulação endotelial negativa é maior do que em ratos Wistar. A pressão de perfusão média basal após lesão endotelial também foi aumentada significativamente nos ratos normotensos e hipertensos, sugerindo a participação do endotélio na manutenção do tônus basal no leito vascular caudal desses animais.

A capacidade de modulação endotelial à agentes vasoconstritores em ratos hipertensos é um tema bastante discutido e conflitivo na literatura. Há trabalhos que demonstram que em animais hipertensos há um aumento da modulação endotelial, enquanto outros relatam um prejuízo da mesma (Arribas *et al*, 1994; Lang *et al*, 1995; Dohi *et al*, 1996; Maeso *et al*, 1999; Chang *et al*, 2002). O fato de haver muitos dados contraditórios pode dever-se em parte, às distintas preparações e artérias utilizadas em cada estudo. Neste trabalho, no entanto, se compararmos somente os ratos Wistar e SHR, podemos sugerir que nos últimos, há uma maior modulação endotelial, fato que não ocorre se compararmos WKY e SHR.

A remoção do endotélio também comprovou que os efeitos da ouabaína sobre a reatividade vascular à fenilefrina são dependentes do mesmo, uma vez que, na sua ausência, essa substância não modificou a reatividade vascular. Há diversos trabalhos na literatura demonstrando que o endotélio é capaz de modular às ações da ouabaína. Assim, estudos como o de Ponte e colaboradores (1996a, b), Sánchez-Ferrer e colaboradores (1992) e Rodriguez-Mañas e colaboradores (1992), realizados respectivamente, em aorta, vasos placentários e artérias carótidas de animais e pacientes normotensos, demonstram que a retirada do endotélio eleva a magnitude da resposta contrátil induzida por ouabaína. Os resultados desses pesquisadores sugerem a existência de uma modulação endotelial inibitória nas contrações induzidas pela ouabaína e que isso ocorre, provavelmente, através da liberação de um fator difusível

que poderia estimular e/ou antagonizar o efeito da ouabaína. Trabalhos do nosso grupo também demonstraram, em ratos normotensos, que 10nM de ouabaína poderia induzir a liberação de um fator vasodilatador derivado do endotélio, possivelmente abridor de canais para potássio (Rossoni *et al*, 1999). Esse mesmo resultado, posteriormente foi obtido em ratos tratados cronicamente com L-NAME (Rossoni *et al*, 2003). Mais recentemente, outro trabalho do nosso grupo, utilizando concentrações ainda menores de ouabaína, verificou que em animais hipertensos, mas não em normotensos, a ouabaína estimulava a liberação local de angiotensina II no leito vascular caudal desses animais (Padilha *et al*, 2004). Portanto, diversos dados sustentam o fato de que a ouabaína exerce a maior parte de seus efeitos periféricos via endotélio. No entanto, as vias endoteliais estimuladas pela ouabaína dependem da concentração dessa substância, do leito arterial estudado e da presença ou não de hipertensão.

Como já havíamos demonstrado anteriormente em ratos SHR, a ouabaína é capaz de liberar angiotensina II endotelial e assim, sensibilizar o leito vascular caudal aumentando a resposta contrátil à fenilefrina (Padilha *et al*, 2004). Ao mesmo tempo, nos estudos *in vivo*, verificamos que, nos ratos Wistar, o aumento da pressão diastólica pela ouabaína foi abolido em presença de losartan. Dessa forma, o próximo passo deste estudo foi averiguar a participação desta via nos efeitos da ouabaína sobre a reatividade vascular à fenilefrina.

Muitos trabalhos mostram uma relação direta entre a angiotensina II e ouabaína. Em vários modelos hipertensão experimental, ou mesmo em ratos normotensos, submetidos à dieta com alta concentração de sódio ou administração central de salina hipertônica, a ouabaína “cerebral” promove liberação de angiotensina II, por fim, resultando num prejuízo do baroreflexo com aumento da atividade simpatoexcitatória e redução da simpatoinibitória (Huang & Leenen, 1996a; Budzikowski & Leenen, 1997; Huang & Leenen; 1998). Além disso, essas ações foram prevenidas após administração de losartan, sugerindo, portanto, a participação do sistema renina-angiotensina nessas ações, via receptores AT1 (Huang *et al*, 1999; Zhang & Leenen, 2001).

Neste estudo, a perfusão com losartan aboliu os efeitos da ouabaína sobre a resposta pressora à fenilefrina nos animais normotensos. Nos ratos Wistar, esse dado corrobora àqueles observados *in vivo*, onde o aumento de pressão diastólica induzido

por ouabaína foi bloqueado em presença de losartan. Já nos ratos WKY, embora a ouabaína não tenha produzido efeitos significativos sobre a pressão arterial, promove aumento da reatividade vascular  $\alpha$ -adrenérgica, via angiotensina II endotelial. No entanto, em ratos hipertensos, outros fatores parecem estar envolvidos já que, somente o aumento de resposta máxima à fenilefrina, produzido por esse digitálico, foi inibido. Recentemente, foi demonstrado que a ouabaína pode estimular a liberação de endotelina pelas células endoteliais (Saunders & Scheiner-Bobis, 2004). Além disso, não podemos descartar uma possível inibição da bomba de sódio pela ouabaína, que por sua vez, poderia amplificar a resposta contrátil à fenilefrina (Ponte *et al*, 1996a, b). De fato Webb & Bohr (1979) verificaram que ratos SHR possuem um aumento na atividade da bomba de sódio. Concordante com esses resultados, Pickar e colaboradores (1994) demonstraram uma *up-regulation* do número de bombas de sódio em músculo esquelético de SHR, devido ao aumento das concentrações de sódio intracelular presentes nesse modelo de hipertensão, e, conseqüentemente, aumento da atividade da bomba. Dessa forma, como esses animais possuem uma maior quantidade e atividade da bomba de sódio, maiores poderão ser os efeitos da ouabaína agindo sobre a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase.

No entanto, vale ressaltar, que existem outras vias pela qual a ouabaína poderia estar atuando, interferindo tanto na atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase, como na resposta pressora à fenilefrina, através da liberação de fatores endoteliais. Esta outra via de ação da ouabaína poderia ocorrer através de sua ligação a uma nova classe distinta de receptores para ouabaína, recentemente descobertos (Ward *et al*, 2002). Segundo esses pesquisadores, esses receptores são saturáveis, específicos para ouabaína, e de alta afinidade, e poderiam estar envolvidos no transporte e/ou regulação da secreção de ouabaína.

Ainda nesse estudo agudo, não foram observadas modificações nas respostas de relaxamento à acetilcolina entre os ratos normotensos e hipertensos. Esses resultados contradizem os de Pourageaud & Freslon (1995) onde demonstraram que o

relaxamento a acetilcolina e bradicinina, é significativamente reduzido em anéis de aorta de ratos SHR quando comparados ao WKY. Concordante com esses resultados, Diederich e colaboradores (1990) verificaram um prejuízo no relaxamento induzido pela acetilcolina em ratos SHRSP (SHR *stroke prone*) e que parece ser devido à liberação de fatores derivados da via da ciclooxigenase interferindo na liberação e/ou ação dos fatores relaxantes derivados do endotélio, já que a presença de meclofenamato, um inibidor dessa via, normalizou o relaxamento dependente do endotélio. As divergências de resultados podem ser ocasionadas por determinadas diferenças como o leito vascular estudado, o agonista utilizado para a liberação dos fatores endoteliais, a idade do animal, a técnica utilizada (anéis ou leito vascular, por exemplo). Portanto, é de se esperar encontrar trabalhos que demonstrem redução, não modificação ou mesmo um aumento da resposta de relaxamento dependente do endotélio (Lee *et al*, 1987; Mantelli *et al*, 1995; Briones *et al*, 1999; Vázquez-Pérez *et al*, 2001).

## **5.2. Estudos crônicos**

Diversos trabalhos têm demonstrado que a administração crônica de ouabaína produz hipertensão em ratos normotensos, sustentando as hipóteses de que este hormônio endógeno está envolvido na gênese e/ ou manutenção da mesma (Huang *et al*, 1994; Manunta *et al*, 1994; Kimura *et al*, 2000; Manunta *et al*, 2001; Rossoni *et al*, 2002a,b; Di Filippo *et al*, 2003; Xavier *et al*, 2004a,b,c). Neste trabalho, em concordância com esses dados, o tratamento por 15 dias com ouabaína foi capaz de elevar a pressão arterial sistólica e diastólica. Além disso, verificamos um aumento de frequência cardíaca nesses animais.

Dois mecanismos estão envolvidos na hipertensão induzida por administração crônica de ouabaína: um mecanismo central e um mecanismo periférico. O mecanismo central está associado a um aumento da atividade simpatoexcitatória e um prejuízo do barorreflexo (Huang *et al*, 1994; Huang & Leenen, 1999). Esses efeitos são prevenidos

por administração de bloqueadores de receptores AT1 para angiotensina II e ET1 para endotelina (Zhang & Leenen, 2001; Di Filippo *et al*, 2003).

Os mecanismos periféricos envolvidos neste modelo de hipertensão, no entanto, parecem refletir alterações compensatórias ou adaptativas à hipertensão. Agudamente, como já mencionado, a ouabaína aumenta a reatividade vascular (Vassallo *et al*, 1997; Rossoni *et al*, 2001; Padilha *et al*, 2004). Entretanto, após administração crônica por 5 semanas desse digitálico, observa-se uma redução da reatividade vascular à fenilefrina e aumento da atividade e expressão da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase (Rossoni *et al*, 2002a). Essa redução da reatividade vascular parece se devido ao aumento da produção de óxido nítrico e maior expressão de eNOS e iNOS (Rossoni *et al*, 2002b).

No entanto, os efeitos vasculares induzidos pelo tratamento crônico com ouabaína diferem quando estudados em artérias de condutância e em artérias de resistência. Em artéria de condutância, como aorta e mesentérica superior, o tratamento por 5 semanas com ouabaína, além de aumentar a produção de NO, diminui a participação dos prostanóides, reduzindo a reatividade à agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (Rossoni *et al*, 2002b; Xavier *et al*, 2004b). Já em artérias mesentéricas de resistência, embora também haja um aumento da produção de NO, há um prejuízo da ação do EDHF, o que mantém a resposta à noradrenalina inalterada nessas artérias (Xavier *et al*, 2004b).

Além das alterações mencionadas acima, também já foi descrito o envolvimento do sistema da endotelina nesse modelo de hipertensão. Em aorta de animais tratados cronicamente com esse digitálico, esse sistema é ativado, além de produzir aumento da expressão de receptores ETa para endotelina-1 (Xavier *et al*, 2004c).

No entanto, todos os efeitos periféricos acima citados foram estudados após o tratamento por 5 semanas com ouabaína. Sabe-se que os aumentos pressóricos ocasionados por esse tratamento já estão estabelecidos após 15 dias (Rossoni *et al*, 2002a,b; Xavier *et al*, 2004a,b). Além disso, as artérias de resistência possuem uma maior contribuição na regulação da resistência periférica total e pressão arterial. Sendo assim, a proposta desse estudo foi investigar se as mesmas mudanças observadas anteriormente em artérias de resistência são as mesmas apresentadas em estágios

iniciais neste modelo de hipertensão ou se àquelas são mecanismos adaptativos ou compensatórios ao processo hipertensivo.

Em concordância com trabalhos anteriores que utilizaram artérias mesentéricas de resistência de ratos tratados por 30 dias com ouabaína, o tratamento por 15 dias também não modificou a resposta pressora à fenilefrina (Xavier *et al*, 2004a,b). A remoção mecânica do endotélio amplificou, de forma similar em ratos controle e ouabaína, a reatividade vascular à fenilefrina. Entretanto, em animais tratados, a preincubação com L-NAME, um inibidor não-seletivo da NOS, induziu um aumento de maior magnitude da curva concentração-resposta à fenilefrina quando comparada ao grupo controle. Esse dado sugere que o tratamento com ouabaína por 15 dias promove uma maior modulação negativa do óxido nítrico sobre a resposta alfa-adrenérgica em vasos de resistência, corroborando estudos prévios (Rossoni *et al*, 2002b; Xavier *et al*, 2004a,b).

Embora esse tratamento com ouabaína tenha sido acompanhado de aumento da liberação de NO, não modificou a expressão protéica da eNOS, ou seja, o aumento na liberação de NO não pode ser atribuído a um aumento na expressão de eNOS, corroborando novamente trabalhos anteriores (Xavier *et al*, 2004b). Esses resultados reforçam a idéia de que existem alterações regionais na hipertensão ouabaína, já que em aorta, o tratamento por 5 semanas, aumenta a expressão de eNOS e iNOS (Rossoni *et al*, 2002a,b).

Sugerimos que o aumento da modulação endotelial nos ratos tratados com ouabaína poderia ser devido a um aumento da atividade da NOS, embora o relaxamento a acetilcolina não tenha diferido nos dois grupos, de acordo com trabalhos prévios (Kimura *et al*, 2000; Rossoni *et al*, 2002a; Xavier *et al*, 2004b). No entanto, já foi demonstrado que o tratamento agudo com ouabaína é acompanhado de aumento na liberação basal de óxido nítrico e não modifica a liberação estimulada por bradicinina (Xie *et al*, 1993).

Apesar do tratamento crônico por 15 dias com ouabaína ter sido acompanhado de aumento da modulação endotelial negativa pelo NO, devemos recordar que a remoção do endotélio amplificou de maneira similar a resposta à fenilefrina. Isso sugere que, se por um lado há aumento de fator vasodilatador, por outro, pode haver um

prejuízo de outro fator vasodilatador e/ou aumento da liberação de um vasoconstrictor de origem endotelial.

Para investigar qual fator poderia estar envolvido, primeiramente testamos a participação da angiotensina II local e atividade da enzima conversora de angiotensina, uma vez que dados do nosso grupo já demonstraram que o tratamento agudo com ouabaína promove a liberação local de angiotensina II via ativação de receptores AT1, em artéria caudal de ratos (Padilha *et al*, 2004). No entanto os efeitos agudos da ouabaína parecem ser distintos dos efeitos crônicos, já que a incubação das artérias com losartan (bloqueador de receptores AT1 para angiotensina II) ou captopril (bloqueador da enzima conversora de angiotensina) não modificou a resposta à fenilefrina nos ratos controle e tratados com ouabaína.

Nakagawa e colaboradores (1987) demonstraram que a ouabaína é capaz de induzir a liberação de prostaciclina em células endoteliais bovinas. Associado a isso, a hipertensão arterial pode alterar a síntese e liberação de prostanóides, o que contribui para as alterações vasculares observadas nesta patologia (Auch-Schwelk & Vanhoutte, 1991; Alvarez *et al*, 2005). Portanto, investigamos essa via incubando as artérias com L-NAME + Indometacina e calculamos a razão da sensibilidade obtida através das curvas de fenilefrina na ausência e presença de L-NAME (Figura 6) e na ausência e presença de L-NAME + Indometacina (Figura 7). Assim, as diferenças encontradas poderiam ser atribuídas à participação dos prostanóides. De acordo com essa análise, nos animais controle, a razão entre a sensibilidade à fenilefrina antes e após L-NAME e antes e após L-NAME + Indometacina não foram diferentes, sugerindo que nas artérias desses animais não há envolvimento de prostanóides nas curvas de concentração-resposta à fenilefrina. Em contrapartida, nos animais ouabaína, a adição de Indometacina reduziu consideravelmente essa razão, sugerindo a liberação de prostanóides nesses animais. Esses resultados diferem daqueles obtidos pelo nosso grupo em artéria mesentérica superior de ratos tratados por 5 semanas com ouabaína, onde houve uma perda da participação dos prostanóides vasoconstritores sobre a reatividade vascular à fenilefrina (Xavier *et al*, 2004b). Isso sugere, mais uma vez, que a hipertensão ouabaína cursa com modificações de reatividade vascular distintas em artérias de condutância e de resistência. Adicionalmente, o tratamento por 15 dias com

ouabaína, mas não em situações controle, foi acompanhado de aumento da expressão protéica de COX-2.

Sabe-se que o NO pode interferir diretamente na síntese de prostanóides e expressão de COX-2 (Salvemini *et al*, 1997; Mollace *et al*, 2005). Essa interação é claramente visualizada em situações inflamatórias onde o NO induz a expressão de COX-2 aumentando a formação de prostaglandinas pró-inflamatórias, elevando a resposta inflamatória (Mollace *et al*, 2005). Ao mesmo tempo, sabe-se que a hipertensão também é acompanhada de processo inflamatório vascular (Sanz-Rosa *et al*, 2005). Dessa forma, uma vez que o tratamento por 15 dias com ouabaína é acompanhado de hipertensão e aumento da liberação de NO, esses fatores, por sua vez, poderiam ser os responsáveis pelo aumento na expressão de COX-2 e liberação de prostanóides.

Além de alterações nas vias do NO e dos prostanóides, dados anteriores do nosso grupo também já relataram que o tratamento crônico por 5 semanas com ouabaína modifica a participação do EDHF na reatividade vascular (Rossoni *et al*, 2002b; Xavier *et al*, 2004b). No entanto, essas modificações dependem do leito vascular estudado. Em artéria caudal, a ouabaína promove a liberação de EDHF, que contribui para a redução da reatividade vascular à fenilefrina (Rossoni *et al*, 2002b). Já em artéria mesentérica de resistência, o mesmo tratamento reduz a liberação de EDHF, que somado ao aumento da participação do NO, não modifica a reatividade vascular à noradrenlina (Xavier *et al*, 2004b).

Para verificar, então, a participação desse fator em estágios mais recentes da hipertensão ouabaína, as artérias foram previamente incubadas com tetraetilamônio (TEA), um bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio, juntamente com L-NAME e indometacina. O pré-tratamento com L-NAME + Indometacina +TEA produziu um desvio adicional para a esquerda nas curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos controle, que foi abolido pelo tratamento crônico com ouabaína. Esses dados sugerem que em artérias mesentéricas de resistência de animais controle, há liberação de EDHF em resposta à fenilefrina, de acordo com dados prévios (Schiffrin, 1996). No entanto, o tratamento com ouabaína por 15 dias, em

concordância com trabalhos anteriores do nosso grupo (Xavier *et al*, 2004b), cursa com um prejuízo na liberação desse fator.

O EDHF é o fator vasodilatador dependente do endotélio predominante em artérias de resistência, ao passo que em artérias de condutância, o NO possui um papel fundamental nesta vasodilatação (Edwards *et al*, 1998; Brandes *et al*, 2000). Uma vez que essas artérias de resistência possuem uma participação importante na regulação da resistência vascular periférica, alterações na síntese ou liberação do EDHF podem ser cruciais em doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial. Ao mesmo tempo, a hipertensão cursa com um prejuízo das ações do NO (Kojda & Harrison, 1999). Recentes estudos indicam que o EDHF pode compensar a perda do NO e preservar o relaxamento dependente do endotélio em artérias mesentéricas de ratos hipertensos (Sofola *et al*, 2002). No entanto, outros dados têm demonstrado uma atenuação deste relaxamento na hipertensão (Sunano *et al*, 1999; Goto *et al*, 2004; Mori *et al*, 2006). As diferenças nesses estudos podem dever-se a diversos fatores, incluindo o tipo de leito vascular estudado.

Neste trabalho, observamos que o tratamento por 15 dias com ouabaína promove uma perda da participação do EDHF e um aumento da modulação endotelial negativa pelo NO na reatividade vascular à fenilefrina. Entretanto, não está claro se o aumento da participação do NO seria um mecanismo compensatório à perda do EDHF. Tem sido demonstrado que a ouabaína, em baixas concentrações, diminui a permeabilidade das junções comunicantes das células musculares lisas de aorta de ratos (Martin *et al*, 2004). Como dito anteriormente, a natureza exata do EDHF ainda é contraditória, no entanto, alguns trabalhos sugerem que o acoplamento elétrico entre as células endoteliais através das junções comunicantes, é fundamental para as ações hiperpolarizantes do EDHF (Taylor *et al*, 1998; Harris *et al*, 2000). Seguindo esse raciocínio, poderíamos sugerir que a síntese do EDHF poderia não estar prejudicada em artérias mesentéricas de resistência de ratos tratados com ouabaína, no entanto, a ação desse fator hiperpolarizante, através das junções comunicantes estaria sendo dificultada pela redução da permeabilidade das mesmas provocadas por esse digitálico. Sendo assim, a participação do EDHF nas respostas vasoconstrictoras à fenilefrina

estariam reduzidas, e em contrapartida, poderia estar havendo maior liberação de NO como um mecanismo compensatório a essa perda.

Além de modificar a síntese e liberação de fatores vasoativos derivados do endotélio, a ouabaína interfere na atividade e expressão da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ,ATPase. Essas alterações na bomba de sódio parecem também depender do tipo de tratamento, agudo ou crônico, e do leito vascular estudado. Trabalhos do nosso grupo (Rossoni *et al*, 1999), demonstraram que 10 nM de ouabaína promove, de forma aguda, inibição parcial da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ,ATPase. Já concentrações ainda mais baixas de ouabaína (1nM) são capazes de aumentar a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ,ATPase no leito vascular caudal e em miócitos ventriculares (Gao *et al*, 2002; Padilha *et al*, 2004).

No entanto, o tratamento crônico com ouabaína por 5 semanas parece induzir alterações regionais na atividade e expressão da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ,ATPase. Dados anteriores do nosso grupo verificaram que em aorta de ratos tratados com ouabaína ocorre aumento da expressão e atividade das isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , ao passo que em mesentérica superior não há modificações nesses parâmetros e em artéria caudal a expressão e atividade dessas isoformas estão reduzidas, em relação ao controle (Rossoni *et al*, 2002a).

Neste trabalho, a atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ,ATPase foi avaliada através da técnica de relaxamento induzida pelo potássio, inicialmente descrita por Webb & Bohr (1978). A adição de potássio, em segmentos previamente contraídos com fenilefrina induziu relaxamento concentração-dependente nos dois grupos estudados. Porém, para se determinar a proporção deste relaxamento que é sensível à ouabaína, outra curva foi realizada na presença de uma concentração de ouabaína já conhecida por ser capaz de inibir a bomba de sódio. Através do cálculo da porcentagem da diferença da área sob a curva (%dAUC) na presença e na ausência de ouabaína, podemos obter o relaxamento atribuído à ativação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ,ATPase. Assim, após incubação com ouabaína, o relaxamento induzido por potássio nas artérias de ambos grupos foi significativamente reduzido. Entretanto, a %dAUC do grupo controle e do grupo ouabaína não diferiram, demonstrando que a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase sensível à ouabaína não é alterada após 15 dias de tratamento com esse digitalíco.

Estes resultados são distintos daqueles observados com tratamento por 5 semanas com ouabaína (Rossoni *et al*, 2002a). Em anéis de aorta, o tratamento com ouabaína, além de aumentar a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, cursa com aumento da expressão protéica das isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  (Rossoni *et al*, 2002a). Tanto o aumento da atividade quanto da expressão das isoformas  $\alpha$  da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, poderiam estar associadas à redução da resposta vasoconstritora à fenilefrina observado nessas artérias (Rossoni *et al*, 2002a). Nesse mesmo estudo, em artéria mesentérica superior, a expressão e atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase não se encontraram alteradas, ao passo que em artéria caudal foram reduzidas. Todos esses dados sugerem que as alterações provocadas pela ouabaína na atividade da bomba de sódio são dependentes do leito vascular estudado e do tempo de tratamento, já que no presente estudo a atividade foi similar em ratos controle e tratados.

No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que as alterações na síntese e liberação de fatores endoteliais vasoativos provocados pela ouabaína também são capazes de interferir na atividade da bomba de sódio. Sabe-se que o NO é um fator capaz de estimular a atividade  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Gupta *et al*, 1994, 1996). Ao mesmo tempo, a PGE<sub>2</sub>, formada pela ativação da via da ciclooxigenase, é um potente inibidor da bomba de sódio (Marín & Redondo, 1999).

Neste trabalho, o tratamento com ouabaína por 15 dias promoveu aumento da liberação de NO e prostanóides vasoconstritores em resposta a estimulação  $\alpha$ -adrenérgica. Dessa forma, não podemos desconsiderar o fato de que esses fatores também poderiam estar interferindo da atividade da bomba de sódio. O fato da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase não ter sido modificada pela ouabaína poderia decorrer, em parte, das ações simultâneas dessas substâncias.

As alterações vasculares aqui observadas pelo tratamento com ouabaína por 15 dias poderiam ser decorrentes de um mecanismo compensatório à hipertensão. No entanto, algumas alterações já descritas neste modelo de hipertensão, como o aumento da modulação do NO e redução da resposta contrátil à fenilefrina encontradas em aorta e em artéria mesentérica superior de ratos não foram prevenidas com o tratamento com losartan (Xavier *et al*, 2004b,c). Estes estudos também demonstraram que a maior

modulação endotelial pelo NO e a perda do EDHF em artérias mesentéricas de resistência também permanecem inalteradas pelo tratamento com losartan (Xavier *et al*, 2004b). No entanto, o tratamento com losartan previne o desenvolvimento de hipertensão arterial induzido pela ouabaína sugerindo que, embora a angiotensina II esteja implicada no desenvolvimento do processo hipertensivo neste modelo, como já previamente descrito (Huang & Lennen, 1999; Zhang & Leenen, 2001), as alterações vasculares periféricas parecem depender de outros mecanismos.

Manunta e colaboradores (2000) verificaram que a digoxina e a digitoxina, ambos compostos digitálicos, ao contrário da ouabaína, não produzem hipertensão em ratos quando administrados cronicamente. Estes resultados sugerem que a hipertensão induzida pela ouabaína pode ser independente da sua capacidade de se ligar e inibir a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Além do mais, o tratamento com ouabaína, mas não com digoxina, promove alterações na reatividade vascular renal (Kimura *et al*, 2000). Recentemente, Ward e colaboradores (2002) descreveram novos sítios de ligação para ouabaína em células adrenocorticais. Desse modo, não podemos descartar a possibilidade de que os efeitos hipertensivos e as alterações vasculares provocadas pelo tratamento crônico com ouabaína poderiam ocorrer através da sua ligação a esses receptores.



## **CONCLUSÕES**

## 6. Conclusão

### 6.1. Estudos Agudos

#### 6.1.1. Estudos Agudos *in vivo*

- A administração aguda de 18µg/Kg de ouabaína (~30 nmol/Kg) é capaz de aumentar a pressão arterial sistólica e diastólica em ratos Wistar e SHR, mas não em ratos WKY.
- Nos ratos Wistar, somente o aumento da pressão arterial diastólica foi prevenido por administração de losartan, sugerindo o envolvimento do sistema renina-angiotensina.
- Nos animais hipertensos, no entanto, os efeitos pressores da ouabaína não foram alterados por administração de losartan, diferentemente do que já havia sido demonstrado por nosso grupo com doses mais baixas de ouabaína (Padilha *et al*, 2004).

Esses dados sugerem que os mecanismos pelos quais a ouabaína promove aumento de pressão arterial de forma aguda dependem da dose utilizada e da presença ou não de hipertensão arterial. Doses menores, como 1nM, não modificam a pressão arterial de ratos normotensos, embora eleve em animais hipertensos através de um mecanismo que envolve a ativação do sistema renina-angiotensina (Padilha *et al*, 2004). Contudo, doses maiores, como a utilizada neste estudo, são capazes de aumentar a pressão arterial em ratos Wistar, através de um mecanismo que, em parte, é devido a angiotensina II. Já em SHR os efeitos pressóricos de concentrações mais elevadas desse digitálico parecem envolver outros mecanismos de ação.

#### 6.1.2. Estudos Agudos *in vitro*

- Em animais normotensos, Wistar e WKY, 1µM de ouabaína aumentou a reatividade vascular do leito vascular caudal à fenilefrina, corroborando dados prévios do nosso laboratório (Vassallo *et al*, 1997; Rossoni *et al*, 2001). Essa alteração é dependente do endotélio, uma vez que na ausência do mesmo, o

efeito da ouabaína na resposta pressora à fenilefrina foi abolido. Essa alteração está associada à liberação de angiotensina II, já que esses efeitos foram prevenidos na presença de losartan.

- No leito vascular caudal de ratos hipertensos (SHR), 1 $\mu$ M de ouabaína também foi capaz de aumentar a reatividade vascular à fenilefrina, de acordo com dados prévios (Vassallo *et al*, 1997; Rossoni *et al*, 2001). Esse efeito é dependente do endotélio e parcialmente associado à liberação de angiotensina II.

Estes resultados sugerem que os efeitos produzidos por concentrações elevadas de ouabaína na reatividade vascular de ratos normotensos, diferentemente do que ocorre com baixas concentrações (10nM), envolvem a liberação local de angiotensina II, que modula positivamente a resposta à fenilefrina.

Já em ratos hipertensos, somente parte do aumento da reatividade vascular à fenilefrina produzida pela ouabaína pode ser atribuído a liberação local de angiotensina II, sugerindo o envolvimento de outras vias endoteliais. Isso difere dos resultados obtidos pelo nosso grupo utilizando concentrações menores desse digitálico (1nM) (Padilha *et al*, 2004). Ao mesmo tempo, sugere que o envolvimento da angiotensina II nas ações vasculares agudas da ouabaína são dependentes da concentração desse digitálico.

Outro dado relevante a considerar é que, ao analisarmos os efeitos de 1nM e 1 $\mu$ M de ouabaína na reatividade vascular de ratos normotensos e hipertensos, esse últimos parecem ser mais sensíveis às ações dessa substância, sugerindo que esse hormônio poderia estar implicado na gênese e/ou manutenção da hipertensão.

## **6.2. Estudos Crônicos**

- O Tratamento crônico com ouabaína por 15 dias não modificou a reatividade vascular à fenilefrina em artérias de resistência. Esses resultados diferem daqueles encontrados com o tratamento por 5 semanas em vasos de condutância (Rossoni *et al*, 2002a,b; Xavier *et al*, 2004b,c), no entanto,

corroboram os dados de Xavier e colaboradores (2004b) em artérias mesentéricas de resistência.

- A reatividade se manteve inalterada provavelmente porque esse tratamento cursou com o aumento da modulação endotelial pelo óxido nítrico, porém com um prejuízo da resposta do fator hiperpolarizante derivado do endotélio, corroborando novamente dados do tratamento crônico por 5 semanas de Xavier e colaboradores (2004b). Vale ressaltar que a expressão protéica para eNOS não foi alterada pela ouabaína, de acordo com dados prévios (Xavier *et al*, 2004b). Além disso, o tratamento por 15 dias também cursa com aumento da liberação de prostanóides vasoconstritores em resposta à fenilefrina e aumento da expressão protéica de COX-2. Esses resultados se contrapõem àqueles observados em vasos de condutância após tratamento por 5 semanas com ouabaína, onde parece haver um prejuízo da liberação de prostanóides (Xavier *et al*, 2004b).

- Diferente do observado em artérias mesentéricas de resistência de ratos tratados por 5 semanas com ouabaína (Xavier *et al*, 2004b), 15 dias de tratamento não foi capaz de modificar a atividade funcional da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ,ATPase.

Esses dados em conjunto demonstram que em estágios mais recentes da hipertensão ouabaína, há uma maior modulação do NO e perda do EDHF, alterações que persistem em estágios mais tardios do tratamento crônico e que podem ser ocasionadas pela ouabaína *per se*. No entanto, outras alterações como a liberação de prostanóides e o aumento da expressão da COX-2, encontradas somente em estágios mais recentes desta hipertensão, parecem contribuir para o estabelecimento da mesma.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. Referências Bibliográficas

Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. (2003). Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 23(8): 1455-9.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.*; 357(Pt 3): 593-615.

Alexander MY, Brosnan MJ, Hamilton CA, Downie P, Devlin AM, Dowell F, Martin W, Prentice HM, O'Brien T, Dominiczak AF. (1999). Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves nitric oxide-dependent endothelial function in a hypertensive rat model. *Cardiovasc Res.*; 43(3): 798-807.

Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. (2000). Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens.*; 13(1 Pt 2):31S-38S.

Alvarez Y, Briones AM, Balfagon G, Alonso MJ, Salaices M. (2005). Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens.*; 23(4): 767-77.

Arai, H; Hori, S; Aramori, I; Ohkubo, H; Nakanishi, S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding and endothelin receptor. *Nature*; 348 (6303): 730-732.

Arnon, A; Hamlyn, JM; Blaustein, MP. (2000). Ouabain augments  $Ca^{2+}$  transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic  $Na^{+}$ . *Am J Physiol.*; 258: H445-H451.

Arribas, S; Marín, J; Ponte, A; Balfagón, G; Salaices, M. (1994). Norepinephrine-induced relaxations in rat aorta mediated by endothelial beta adrenoceptors. Impairment by aging and hypertension. *J Pharmacol Expe Therap.*; 271 (2): 520-527.

Auch-Schwelk W, Vanhoutte PM. (1991). Endothelium-derived contracting factor released by serotonin in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens.*; 4(9): 769-72.

Baker, RR. (1990). The eicosanoids: a historical overview. *Clin Biochem.*; 23 (5): 455-458.

Bakris, GL; Mensah, GA. (2002). Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiol Clin.*; 20 (2): 195-206.

Bauer N, Muller-Ehmsen J, Kramer U, Hambarchian N, Zobel C, Schwinger RH, Neu H, Kirch U, Grunbaum EG, Schoner W. (2005). Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of beta-blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension*; 45(5): 1024-8.

Bealer, SL; Haywood, JR; Gruber, KA; Buckalew, VM Jr; Fink, GD; Brody, MJ; Johnson, AK. (1983). Preoptic-hypotalamic periventricular lesions reduce natriuresis to volume expansion. *Am J Physiol.*; 244(1): R51-R57.

Beckman, J.S.; Beckman, T.W.; Chen, J.; Marshall, P.A.; Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624.

Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC. (2001). NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*; 38(5): 1107-11.

Blanco, G. & Mercer, R.W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.*; 275: F633-F650.

Blaustein, M.P. (1993). Physiological effects of endogenous ouabain: control of intra- cellular  $Ca^{2+}$  stores and cell responsiveness. *Am J Physiol*; 264:C1367-C1387.

Blaustein, M.P.; Juhaszova, M.; Golovina, V.A. (1998). The cellular mechanism of action of cardiotonic steroids: A new hypothesis. *Clin Exp Hypertens.*; 20: 691-703.

Blaustein, MP. (1988). Sodium/calcium exchanger and the control of contractility in cardiac muscle and vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 12: S56-S68.

Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. (1998). Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*; 98(18): 1842-7.

Boulanger, CM; Lüscher, TF. (1991). Differential effect of cyclic GMP on the release of endothelin-1 from culture endothelial cells and intact porcine aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 17 (Suppl 7): S264-S266.

Bova, S.; Blaunstein, M.P.; Ludens, J.H.; Harris, D.W.; DuCharme, D.W.; Hamlyn, J.M. (1991). Effects of an endogenous ouabainlike compound on heart and aorta. *Hypertension*; 17: 944-950.

Bradford, M.M. (1976). A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem*.72: 48-54.

Brandes, R.P.; Schmitz-Winnenthal, F.H.; Feletou, M.; Godecke, A.; Hunag, P.L.; Vanhoutte, P.M.; Fleming, I.; Busse, R. (2000). An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Nat Acta Sci USA*.; 97: 9747-9752.

Bredt DS, Snyder SH. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*.; 87(2): 682-5.

Bredt DS, Snyder SH. (1992). Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*.; 8(1):3-11. Review.

Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Miguel M, Salaices M. (2002). Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*.; 39(3): 378-88.

Briones, A.M.; Alonso, M.J.; Marín, J.; Salaices, M. (1999). Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol*.; 126:111-120.

Brock, JA; van Helden, DF; Dosen , P; Rush, RA. (1996). Prevention of high blood pressure by reducing sympathetic innervation in the spontaneously hypertensive rats. *J Auton Nerv Sys.*; 61 (2): 97-102.

Buckalew, VM Jr; Marinez, FJ; Green, WE. (1970). The effect of dialysates and ultra filltrates of plasma of saline loaded dogs on toad bladder sodium transport. *J Clin Invest.*; 49: 926-935.

Budzikowski, AS; Leenen, FH. (1997). Brain “ouabain” in the median nucleus mediates sodium-sensitive hypertension in spontaneously rats. *Hypertension*; 27 (2): 599-605.

Bumpus, FM; Catt, FJ; Chiu, AT; DeGasparo, M; Goodfriend, T; Husain, A; Peach, MJ; Taylor, DG Jr; Timmermans, PB. (1991). Nomenclature for angiotensin receptor. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*. 17 (5): 720-721.

Capponi, AM. (1996). Distribution and signal transduction of angiotensin II AT1 and AT2 receptors. *Blood Pres Suppl.*; 2: 41-46.

Carey, RM; Jin, XH; Seragy, HM. (2001). Role of the angiotensin AT2 receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications. *Am J Hypertens.*; 14: 985-1025.

Casteels, R.; Raeymaekers, L.; Droogmans, G.; Wuytak, F. (1985). Na,K-ATPase exchange and excitation-contraction coupling in smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.*;7:103-110.

Ceron PI, Bendhack LM. (1997). Increased contractile response induced with ouabain is abolished by thapsigargin in aorta of renal hypertensive rats. *Gen Pharmacol.*; 29(5): 707-12.

Chang, HR; Lee, RP; Wu, CY; Chen, HI. (2002). Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: a comparison between rats with normotension and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*; 29 (4): 275-280.

Chataigneau T, Feletou M, Huang PL, Fishman MC, Duhault J, Vanhoutte PM. (1999). Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Br J Pharmacol.*; 126(1):219-26.

Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. (2001). Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*; 38(3 Pt 2): 606-11.

Cheung WJ, Kent MA, El-Shahat E, Wang H, Tan J, White R, Leenen FH. (2006). Central and peripheral renin-angiotensin systems in ouabain-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 291(2): H624-30.

Clough, DL; Pamnani, MB; Haddy, FJ. (1983). Decreased myocardical  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  activity in one-kidney, one clip hypertensive rats. *Am J Physiol.*; 245: H244-H251.

Costerousse, O; Jaspard, E; Allegrini, J; Wei, L; Alhenc-Gelas, F. Angiotensin I converting enzyme (Kininase II). (1992). Molecular organization and regulation of its expression in humans. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 20 (supl 9): S10-S15.

D'Amico, M.; Di Filippo, C.; Piegari, E.; Rinaldi, B.; Rossi, F.; Filippelli A. (2003). ET<sub>A</sub> endothelin receptors are involved in the ouabain-induced haemodynamic effects in the periaqueductal gray area of rats. *Life Sci.*; 72: 2211-2218.

Danser, AH; Koning, MM; Admiral, PJ; Jassen, LM; Verdouw, PD; Schalekamp, MA. (1992). Production of angiotensins I and II at tissues sites in intact pigs. *Am J Physiol.*; 263: H429-H437.

David-Duflho, M; Devynck, MA; Beugras, JP; Meyer, P. (1984). Quantitative changes in cardiac Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> adenosine triphosphatase of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 6(2): 271-280.

Davidge ST. (2001). Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res.*; 89(8): 650-60.

Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, Tsao PS, Kimoto M, Vallance P, Patterson AJ, Cooke JP. (2003). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation*; 108(24): 3042-7.

de Gasparo M, Rogg H, Brink M, Wang L, Whitebread S, Bullock G, Erne P. (1995). Angiotensin II receptor subtypes and cardiac function. *Eur Heart J.*; 15 Suppl D:98-103.

de Richelieu LT, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH, Salomonsson M. (2005). NO-independent mechanism mediates tempol-induced renal vasodilation in SHR. *Am J Physiol Renal Physiol.*; 289(6): F1227-34.

de Wardener, H.E. & Clarkson, E.M. (1985). Concept of natriuretic hormone. *Physiol Rev.*; 65: 658-759.

de Wardener, HE; Mills, IH; Clapham, WF; Hayter, CJ. (1961). Studies on the efferent mechanisms of the sodium diuresis which follows administration of intravenous saline in dog. *Clin Sci.*; 21: 249-258.

DeWitt DL, Day JS, Sonnenburg WK, Smith WL. (1983). Concentrations of prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin I<sub>2</sub> synthase in the endothelium and smooth muscle of bovine aorta. *J Clin Invest.*; 72(6): 1882-8.

Di Filippo, C.; Filippelli, A.; Rinaldi, B.; Piegari, E.; Esposito, F.; Rossi, F.; D'Amico, M. (2003). Chronic peripheral ouabain treatment affects the brain endothelin system of rats. *J Hypertens.*; 21: 747-753.

Dickhout, JG; Lee, RMK. (1998). Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.*; 274 (43): H794-H800.

Diederich, D; Yang, ZH; Buhler, FR; Lüscher, TF. (1990). Impaired endothelium-dependent relaxations in hypertensive resistance arteries involve cyclooxygenase pathway. *Am J Physiol.*; 258: H445-H451.

Dohi Y, Ohashi M, Sugiyama M, Takase H, Sato K, Ueda R. (2003). Candesartan reduces oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *Hypertens Res.*; 26(9): 691-7.

Dohi, Y; Kojima, M; Sato, K. (1996). Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension*; 28: 732-737.

Dohi, Y; Thiel, MA; Buhler, FR; Lüsher, TF. (1990). Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries: effect of age and hypertension. *Hypertension.*; 16: 170-179.

Dostanic I, Paul RJ, Lorenz JN, Theriault S, Van Huysse JW, Lingrel JB. (2005). The alpha2-isoform of Na-K-ATPase mediates ouabain-induced hypertension in mice and increased vascular contractility in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 288(2): H477-85.

D'Urso G, Frascarelli S, Balzan S, Zucchi R, Montali U. (2004). Production of ouabain-like factor in normal and ischemic rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 43(5): 657-62.

Dzau VJ. (1989). Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses. *J Hypertens.*; 7(12): 933-6.

Dzau, VJ. (1984a). Vascular renin-angiotensin: a possible autocrine or paracrine system in control of vascular functions. *J Cardiov Pharmacol.*; 6 Suppl 2: S377-S382.

Dzau, VJ. (1984b). Vascular wall renin-angiotensin pathway in control of the circulation. A hyphotesis. *Am J Med.*; 77 (4a): 31-36.

Edwards G, Feletou M, Gardener MJ, Thollon C, Vanhoutte PM, Weston AH. (1999). Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br J Pharmacol.*;128(8):1788-94.

Edwards, G.; Dora, K.A.; Gardener, M.J.; Garland, C.J.; Weston, A. (1998). K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*; 96: 269-272.

Ennis IL, Alvarez BV, Camilion de Hurtado MC, Cingolani HE. (1998). Enalapril induces regression of cardiac hypertrophy and normalization of pHi regulatory mechanisms. *Hypertension*; 31(4): 961-7.

Félétou M & Vanhoutte, PM (1988). Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol.*; 93: 515-524.

Félétou, M; Vanhoutte, PM. (1999). The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. *J Physiol Pharmacol.*; 50 (4): 525-534.

Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. (1995). Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest.*; 95(4): 1669-75.

Fernández-Alfonso, MS; González, C. (1999). Nitric oxide and the renin-angiotensin system. Is there a physiological interplay between the system? *J Hypertens.*; 17 (10): 1355-1361.

Ferreira AJ, Santos RA. (2005). Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res.*; 38(4): 499-507.

Fleming, WW. (1980). The eletrogenic  $\text{Na}^+\text{K}^+$  pump in smooth muscle: phisiology and pharmacology significance. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.*; 62: 347-504.

Folkow, B. Physiological aspects of primary hypertension. (1982). *Physiol Rev.*; 62: 347-504.

Forstermann, U; Nakane, M; Tracey, WR; Pollock, JS. (1993). Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J.*; 14 (Suppl 1): 10-15.

Fortuno A, Jose GS, Moreno MU, Diez J, Zalba G. (2005). Oxidative stress and vascular remodelling. *Exp Physiol.*; 90(4): 457-62.

França, AS; Rossoni, LV; Amaral, SMC; Vassallo, DV. (1997). Reactivity of the isolated perfused rat tail vascular bed. *Br J Med Biol Res.*; 30: 891-895.

Freis, ED. Age, race and sex and other indices of risk in hypertension. (1973). *Am J Med.*; 55: 275-280.

Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*; 201 (4359): 875-880.

Frolich, JC; Forstermann, V. (1989). Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.*; 19: 211-215.

Furchgott, RF; Zawadzski, JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*; 288: 373-376.

Furukawa, KJ; Ohshima, N; Tawada-Iwata, Y; Shigekawa, M. (1991). Cyclic GMP stimulates  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in VSMCs in primary culture. *J Biol Chem.*; 226: 12337-12241.

Gao, J; Wymore, RS; Wang, Y; Gaudette, GR; Krukenkamp, IB; Cohen, IS; Mathias, RT. (2002). Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides. *J Gen Physiol.*; 119 (4): 297-312.

Ge T, Hughes H, Junquero DC, Wu KK, Vanhoutte PM, Boulanger CM. (1995). Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H2 in the SHR aorta. *Circ Res.*; 76(6): 1003-10.

Geering K. (2006). FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol.*; 290(2): F241-50.

Goldstein, S. & Czapski, G. (1995) The reaction of  $\text{NO}^-$  with  $\text{O}_2^-$  and  $\text{HO}_2^-$  a pulse radiolysis study. *Free Radical Biol Med.*; 19:505-510.

Golovina, VA; Blaustein, MP. (1997). Spatially and functionally distinct  $\text{Ca}^{2+}$ -stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Sciences*; 275 (5306): 1643-1648.

Goto K, Rummery NM, Grayson TH, Hill CE. (2004). Attenuation of conducted vasodilatation in rat mesenteric arteries during hypertension: role of inwardly rectifying potassium channels. *J Physiol.*; 561(Pt 1): 215-31.

Gottlieb, S.S.; Rogowski, A.C.; Weinberg, M.; Krichten, C.M.; Hamilton, B.P.; Hamlyn, J.M. (1992). Elevated concentration of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation*; 86(2): 420-425.

Griendling, KK; Ushio-Fukai, M; Lassegue, B; Alexander, RW. (1997). Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension*; 29: 366-373.

Grossman, JD; Morgan, JP. (1997). Cardiovascular effects of endothelin. *News Physiol Sci*; 12; 113-117.

Gruber, K.A.; Whitaker, J.M.; Buckalew, V.M. (1980). Endogenous digital-like substance in plasma volume expanded dogs. *Nature*; 287:743-745.

Grunfeld, S; Hamilton, CA; Mesaros, S; Mc Clain, SW; Dominiczak, AF; Bohr, DF; Malinski, T. (1995). Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension*; 26: 854-857.

Gryglewski, RJ; Botting, RM; Vane, JR. (1988). Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension*; 12: 530-548.

Gryglewski, RJ; palmer, RMJ; Moncada, J. (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 320: 454-456.

Gupta, S.; McArthur, C.; Grady, C.; Ruderman, N.B. (1994). Stimulation of vascular Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am J Physiol*; 266: H2146-H2151.

Gupta, S.; Phipps, K.; Ruderman, N.B. (1996). Differential stimulation of Na<sup>+</sup> pump activity by insulin and nitric oxide in rabbit aorta. *Am J Physiol*; 270: H1287-H1293.

Haddy F.J. (1983). Potassium effects on contraction in arterial smooth muscle mediated by Na, K-ATPase. *Fed. Proc.*; 42:239-245.

Haddy, F.J. & Overbeck, H.W. (1976). The role of humoral agents in volume expanded hypertension. *Life Sci.*; 19:935-947.

Haddy, FJ; Pamnani, MB; Clough, D. (1978). Sodium-potassium pump in volume expanded hypertension. *Clin Exp Hypertens.*; 1 (3): 295-336.

Hamilton, C.A.; Brosnan, M.J.; McIntyre, M.; Graham, D.; Dominiczak, A.F. (2001). Superoxide excess in hypertension and aging. A common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension*; 37 [part 2]:529-534.

Hamlyn, J.M.; Hamilton, B.P.; Manuta, P. (1996). Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis. *Journal of Hypertension*; 14: 151-171.

Hamlyn, J.M.; Ringel, R.; Schaeffer, J.; Levinson, P.D.; Hamilton, B.P.; Kowarski, A.A.; Blaustein, M.P. (1982). A circulating inhibitor of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase associated with essential hypertension. *Nature*; 300:650-652.

Hamlyn, JM; Blaustein, MP; Bova, S; DuCharme, DW; Mandel, F; Mathews, WR; Ludens, JH. (1991). Identification and characterization of an ouabain-like compound from human plasma. *Proc Nat Acta Sci USA*, 1991; 88: 6259-6263.

Harrap, SB. Hypertension: genes versus environment. (1994). *Lancet*; 344 (8916): 169-171.

Harris, D.; Martin, P.E.M.; Evans, W.H.; Kendall, D.A.; Griffith, T.M. Randall, M.D. (2000). Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses and mechanisms of K<sup>+</sup>-relaxation. *Eur J Pharmacol.*; 402: 119–128.

Hasegawa, T.; Masugi, F.; Ogihara, T.; Kumuhara, Y. (1987). Increase in plasma ouabainlike inhibitor of  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  with high sodium intake in patients with essential hypertension. *J Clin Hypertens.*; 3:419-429.

Hauptert, GT; Sancho, JM. (1979). Sodium transport inhibitor from bovine hypothalamus. *Proc Nat Acta Sci USA*; (9): 4658-4660.

He S, Shelly DA, Moseley AE, James PF, James JH, Paul RJ, Lingrel JB. (2001). The alpha(1)- and alpha(2)-isoforms of Na-K-ATPase play different roles in skeletal muscle contractility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 281(3): R917-25.

Heller, R; Polack, T; Grabner, K; Tell, V. (1999). Nitric oxide inhibits proliferations of human endothelial cells via mechanisms independent of cGMP. *Atherosclerosis*; 144 (1): 49-57.

Hilgers RH, Webb RC. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. (2005). *Exp Biol Med (Maywood)*; 230(11):829-35.

Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. (1998). Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension*; 32(3): 387-92.

Hopp, L; Khalil, F; Tamura, H; Kino, M; Searle, BM; Tokushige, A; Aviv, A. (1986). Ouabain binding to culture vasuclar smooth muscle cells of the spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.*; 250 (6 Pt 1): C948:C954.

Horisberger JD. (2004). Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology*; 19: 377-87.

Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. (1999). Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*; 33(2):613-21.

Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. (1996). Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.*; 76(4):967-1003.

Huang A, Sun D, Koller A. (2000). Shear stress-induced release of prostaglandin H(2) in arterioles of hypertensive rats. *Hypertension*; 35(4): 925-30.

Huang, B.S. & Leenen, F.H.H. (1994). Brain ouabain mediates the sympathoexcitatory and hypertensive effects of high sodium intake in Dahl salt-sensitive rats. *Circ Res.*; 74: 586-595.

Huang, B.S. & Leenen, F.H.H. (1996a). Blockade of brain ouabain prevents sympathoexcitatory and pressor responses to high sodium in SHR. *Am J Physiol.*; 271(10): H103-H108.

Huang, B.S. & Leenen, F.H.H. (1996b). Brain ouabain and angiotensin II in salt-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*; 28: 1005-1012.

Huang, B.S. & Leenen, F.H.H. (1999). Brain renin-angiotensin system and ouabain induced sympathetic hyperactivity and hypertension in wistar rats. *Hypertension*; 34: 107-112.

Huang, BS; Leenen, FH. (1998). Both brain angiotensin II and "ouabain" contribute to sympathoexcitacion and hypertension in DahlS rats on high salt intake. *Hypertension*; 32(6): 1028-1033.

Huang, BS; Veerashingam, SJ; Leenen, FH. (1998). Brain "ouabain", Ang II and sympathoexcitation by chronic central sodium loading and rats. *Am J Physiol.*; 275 (4 Pt 2): H1269-1276.

Huie, RE; Padmaja, S. (1993). The reaction of NO with superoxide. *Free Rad Res Commun.*; 18 (4): 195-199.

Ignarro, LJ; Kadowitz, PJ. (1985). The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.*; 25: 171-191.

Inoue, A; Yanagisawa, M; Kimura, S; Kasuya, Y; Miyauchi, T; Goto, K; Masaki, T. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 8: 2863-2867.

Intengan, H.D. & Schiffrin, E.L. (2000). Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*, 36:312-318.

Ishikawa, K; Ihara, M; Noguchi, K; Mase, T; Mino, T; Saeki, T; Fukuroda, T; Fukami, T; Ozaki, S; Nagase, T. (1994). Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci USA*; 214 (2-3): 4892-4896.

James PF, Grupp IL, Grupp G, Woo AL, Askew GR, Croyle ML, Walsh RA, Lingrel JB. (1999). Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol Cell.*; 3(5): 555-63.

Jones, LG; Gause, KC; Meier, KE. (1996). Effects of endothelin on mitogen-activated protein kinase activity and protein synthesis in isolated adult feline cardiac myocytes. *Life Sci.*; 58 (7): 617-630.

Juhaszova, M; Shimizu, H; Borin, ML; Yip, RK; Santiago, EM; Lindermayer, GE; Blaustein, MP. (1996). Localization of the Na(+)-Ca(2+) exchanger in vascular smooth muscle, and in neurons and astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 779: 318-335.

Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. (1997). Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev*; 49(2): 157-230.

Karaki, H. & Urakawa, N. (1977). Effects of ouabain and potassium-free solution on the contractions of isolated blood vessels. *Eur J Pharmacol.*;48:439-443.

Kerr, S; Brosnan, MJ; Mc Intyre, M; Reid, JL; Dominiczak, AF; Hamilton, CA. (1999). Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: the role of the endothelium. *Hypertension*; 33: 1353-1358.

Khalil, R; Menice, CB; Wang, CLA; Morgan, KG. (1995). Phosphotyrosine-dependent targeting of mitogen-activated protein kinase in differentiated contractile vascular cells. *Circ Res.*; 76: 1101-1108.

Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, Hoepfer MM, Haller H, Fliser D. (2004). Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation*; 109(2): 172-7.

Kifor, I; Dzau, VJ. (1987). Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res.*; 60 (3): 422-428.

Kimura, K.; Manunta, P.; Hamilton, B.P.; Hamlyn, J.M. (2000). Different effects of in vivo ouabain and digoxin on renal artery function and blood pressure in the rat. *Hypertens Res.*; 23 (suppl): 67-76.

Knowles RG, Moncada S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.*; 298 ( Pt 2): 249-58.

Kojda G, Harrison D. (1999). Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.*; 43(3): 562-71.

Kramer, H; Gonick, H; Paul, W. (1969). Third factor: Inhibition of the  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ ? Em *Proceedings of the Fourth International Congress on Nephrology*. New York: Karger, 1969; 373.

Kubes, P; Suzuki, M; Granger, DN. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Nat Acad Sci USA*; 88(11): 4651-4655.

Lais, LT; Rios, LL; Boutelle, S; Dibona, GF; Brody, MJ. (1977). Arterial pressure development in neonatal and young spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels*; 5: 277-284.

Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. (1992). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89(14): 6348-52.

Lang, MG; Noll, G; Lüsher, TF. (1995). Effect of aging and hypertension on contractility of resistance arteries: modulation by endothelial factors. *Am J Physiol.*; 269 (38): H837-H844.

Laredo, J.; Hamilton, B.P.; Hamlyn, J.M. (1994). Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. *Endocrinology*; 135:794-797.

Laredo, J.; Shah, J.R.; Lu, Z.R.; Hamilton, B.P.; Hamlyn, J.M. (1997). Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptor. *Hypertension*; 29(part2):401-407.

Laredo, J; Ramilton, BP; Hamlyn, JM. (1995). Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells: role of the zone glomerulosa and zona fasciculata. *Biochem Biophys Res Comm.*; 212 (2): 487-493.

Lee, TJ; Shirasaki, Y; Nickols, GA. (1987). Altered endothelial modulation of vascular tone in aging and hypertension. *Blood Vessels*; 24 (3): 132-136.

Leenen, F.H.H.; Harmsen, E.; Yu, H. (1994). Dietary sodium and central vs peripheral ouabain-like activity in Dahl salt-sensitive vs salt-resistant rats. *Am J Physiol.*; 267(36): H1916-H1920.

Lincoln, TM. (1989). Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Therap.*; 51: 479-502.

Lingrel, J.B. (1992). Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. *J Bioenerg Biomembr.*; 24: 263-270.

Lograno MD, Daniele E, Galli C. (1989). Changes of vascular smooth muscle reactivity in hypertensive rats. *Pharmacol Res.*; 21(6): 719-28.

Ludens, J.H.; Clark, M.A.; DuCharme, D.W.; Harris, D.W.; Lutzke, B.S.; Mandel, F.; Mathews, W.R.; Sutter, D.M.; Hamlyn, J.M. (1991). Purification of an endogenous digitalislike factor from human plasma for structural analysis. *Hypertension*; 17: 923-929.

Ludens, J.H.; Clark, M.A.; Robinson, F.G.; DuCharme, D.W. (1992). Rat adrenal cortex is a source of a circulating ouabain-like compound. *Hypertension*; 19:721-724.

Luscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM. (1990). Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens.*; 3(1): 55-8.

Maeso, R; Navarro-Cid, J; Rodrigo, E; Ruilope, LM; Cachofeiro, V; Lahera, V. (1999). Effects of antihypertensive therapy on factors mediating endothelium-dependent relaxations in rats treated chronically with L-NAME. *J Hypertens.*; 17: 221-227.

Mantelli, L; Amerini, S; Ledda, F. (1995). Roles of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in vasorelaxant effect of acetylcholine as influenced by aging and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 25: 595-602.

Manunta, P.; Hamilton, B.P.; Hamlyn, J.M. (2001). Structure-activity relationship for the hypertensinogenic activity of ouabain: role of the sugar and lactone ring. *Hypertension*; 37: 471-477.

Manunta, P.; Hamilton, J.; Rogowski, A.C.; Hamilton, B.P.; Rogowski, A.C.; Hamlyn, J.M. (2000). Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: antihypertensive effect of digoxin and digitoxin. *Hypertens Res.*; 23(Suppl): S77-S85.

Manunta, P.; Rogowski, A.C.; Hamilton, B.P.; Hamlyn, J.M. (1994). Ouabain-induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure. *J Hypertens.*; 12: 549-560.

Marín J, Sanchez-Ferrer CF, Salaices M. (1988). Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. *Br J Pharmacol.*; 93(1): 43-52.

Marín, J. & Redondo, J. (1999). Vascular Sodium Pump: Endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. *Pharmacol Therapeut*; 84: 249-271.

Marín, J.; Fernández-Alfonso, M.S.; Sánchez-Ferrer, C.F. (1991). Sodium pump activity and contractile effects of ouabain in human placental veins. *Eur J Pharmacol.*; 201:75-82.

Marín, J; Rodríguez-Martínez, MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. (1997). *Pharmacol Therap.*; 75 (2): 111-134.

Martin, P.E.M.; Hill, N.S., Kristensen, B.; Errington, R.J.; Rachel, J.T.M. (2004). Ouabain exerts biphasic effects on connexin functionality and expression in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*; 140: 1261-1271.

Masferrer, JL; Seibert, K; Zweifel, B; Needleman, P. (1992). Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89: 3917-3921.

Mathews, W.R.; DuCharme, D.W.; Hamlyn, J.M.; Harris, D.W.; Mandel, F.; Clark, M.A.; Ludens, J.H. (1991). Mass spectral characterization of an endogenous digitalislike factor from human plasma. *Hypertension*; 17: 930-935.

Meisherei, KD; Taylor, CJ; Saneii, H. (1991). Synthetic atrial peptide inhibits intracellular  $Ca^{2+}$  release in smooth muscle. *Am J Physiol*; 250: C171-C174.

Mercer, R.W.; Blemesderfer, D.; Bliss, D.P.; Collins, J.H.; Forbush, B. (1993). Molecular cloning and immunological characterization of the  $\gamma$ -polypeptide, a small protein associated with the Na, K-ATPase. *J Cell Biol*; 121: 579-586.

Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. (2005). Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev*; 57(2): 217-52.

Moncada, S; Herman, AG; Higgs, EA; Vane, JR. (1977). Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Trombosis Research*; 11: 323-344.

Moncada, S; Palmer, RMJ; Higgs, EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.*; 43: 109-142.

Morgan L, Broughton Pipkin F, Kalsheker N. (1996). Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol.*; 28(11): 1211-22.

Morgan, K; Lewis, MD; Supurlock, G; Collins, PA; Foord, JM; Southgate, K; Scanlon, MF; Mir, MA. (1985). Characterization and partial purification of the sodium-potassium-ATPase inhibitor release from culture rat hypothalamic cells. *J Biol Chemis.*; 260: 13595-13600.

Mori Y, Ohyanagi M, Koida S, Ueda A, Ishiko K, Iwasaki T. (2006). Effects of endothelium-derived hyperpolarizing factor and nitric oxide on endothelial function in femoral resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.*; 29(3): 187-95.

Mulvany M.J. (2002). Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci.*; 17:105-109.

Mulvany MJ. (1992). A reduced elastic modulus of vascular wall components in hypertension? *Hypertension*; 20(1): 7-9.

Mulvany, M.J. & Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.*; 41: 19-26.

Mulvany, M.J. (2003). Structural abnormalities of the resistance vasculature in hypertension. *J Vasc Res*; 40:558-560.

Naftilan AJ, Zuo WM, Inglefinger J, Ryan TJ Jr, Pratt RE, Dzau VJ. (1991). Localization and differential regulation of angiotensinogen mRNA expression in the vessel wall. *J Clin Invest.*; 87(4): 1300-11.

Nakagawa, M.; Takamatsu, H.; Toyoda, T.; Sawada, S.; Tsuji, H.; Ijichi, H. (1987). Effect of inhibition of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase on the prostacyclin generation of cultured human vascular endothelial cells. *Life Sci.*; 40: 351-357.

Narumiya, S; Sugimoto, Y; Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptor: structure, properties, and function. *Physiol Rev.*; 70 (4): 1193-1226.

Naruse, K; Naruse, M; Tanabe, A; Yoshimoto, T; Watanabe, Y; Kurimoto, F; Horiba, N; Tamura, M; Inagami, T; Demura, H. (1994). Does plasma immunoreactive ouabain originate from the plasma adrenal gland? *Hypertension*; 23 (suppl I): I102- I105.

Nathan C. (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest.*; 100(10): 2417-23.

Nava, E; Farré, AL; Moreno, C; Casado, S; Moreau, P; Consentino, F; Lüscher, TF. (1998). Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens.*; 16: 609-615.

Nava, E; Noll, G; Lüscher, TF. (1995). Increased activity of constitutive nitric oxide synthase in cardiac endothelium in spontaneously hypertension. *Circulation*; 91 (9): 2310-2313.

Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. (1990). Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol*; 259: C3–18.

Nickenig G, Harrison DG. (2002). The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation*; 105(3): 393-6.

Ohnishi, J; Ishido, M; Shibata, T; Inagami, T; Murakami, K; Miyazaki, H. (1992). The rat angiotensin II AT1A receptor couples with three different signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res Commun.*; 186 (2): 1094-1100.

Osol, G.; Cipolla, M.; Knutson, S. (1989). A new method for mechanically denuding the endothelium of small (50-150  $\mu$ m) arteries with human hair. *Blood Vessels*; 26: 320-324.

Overbeck HW. (1984). Effect of ouabain on arteriolar responses to norepinephrine in chronic, benign, volume-expanded hypertension. *Hypertension*; 6(2 Pt 2): 182-7.

Overbeck, H.W.; Pamnani, M.B.; Akera, T.; Brody, T.M.; Haddy, F.J. (1976). Depressed function of a ouabain-sensitive sodium-potassium pump in blood vessels from renal hypertensive dogs. *Circ Res.*; 38(suppl 2):II48-II52.

Ozaki. H; Karaki, H.; Urakawa, N. (1978). Possible role of Na-Ca exchange mechanism in contractions induced in guinea-pig aorta by potassium-free solution and ouabain. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv Pharmacol.*; 304:203-209.

Padilha, A.S. Rossoni, L.V.; Xavier, F.E.; Vassallo, D.V. (2004). Ouabain at nanomolar concentration promotes the synthesis and release of angiotensin II from

the endothelium of the tail vascular bed of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 44:372-380

Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.*; 153(3): 1251-6.

Palmer, RM; Ferrige, AG; Moncada, S. (1987). Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*; 327: 524-526.

Pamnani, M.; Huot, S.; Buggy, J.; Clough, D.; Haddy, F.J. (1981). Demonstration of a humoral inhibitor of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump in some models of experimental hypertension. *Hypertension*; 3(suppl II): II96-II101.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. (1990). Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.*; 323(1): 22-7.

Pickar, JG; Carlsen, RC; Atrakchi, A; Gray, SD. (1994). Increased Na(+)-K(+) pump number and decrease pump activity in soleus muscles in SHR. *Am J Physiol.*; 267: 836-844.

Pollock, DM; Keith, TL; Lighsmith, RF. (1995). Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J.*; 9 (12): 1196-1204.

Ponte, A.; Marín, J.; Arribas, S.; González, R.; Barrús, M.T.; Salaices, M.; Sánchez-Ferrer, C.F. (1996a). Endothelial modulation of ouabain-induced

contraction and sodium pump activity in the aorta of normotensive Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res.*; 33: 164-174.

Ponte, A.; Sánchez-Ferrer, C.F.; Hernández, C.; Alonso, M.J.; Marín, J. (1996b) Effect of ageing and hypertension on endothelial modulation of ouabain-induced contraction and sodium pump activity in the rat aorta. *Journal of Hypertension*; 14: 705-711.

Pourageaud, F; Freslon, JL. (1995). Endothelial and smooth muscle properties of coronary and mesenteric resistance rats compared to WKY rats. *Fund Clin Pharmacol.*; 9 (1): 37-45.

Quignard, JF; Féletou, M; Duhault, J; Vanhoutte, PM. (1999). Potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factors in the isolated carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.*; 127: 27-34.

Quilley, J; Fulton, D; Mc Giff, JC. (1997). Hyperpolarizing factor. *Biochem Pharmacol.*; 54: 1059-1070.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.*; 97(8): 1916-23.

Ralymaekers, L; Hofmann, F; Casteels, R. (1988). Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle cells. *Biochem J.*, 252 (1): 269-273.

Rapoport RM, Williams SP. (1996). Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension*; 28(1): 64-75.

Rapoport, RM; Murad, F. (1983). Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in the aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res.*; 52: 353-357.

Rathaus M, Bernheim J. (2002). Oxygen species in the microvascular environment: regulation of vascular tone and the development of hypertension. *Nephrol Dial Transplant.*; 17(2): 216-21.

Reilly, M; Fitzgerald, GA. (1993). Cellular activation by thromboxane A<sub>2</sub> and the other eicosanoids. *Eur Heart J.*; 14 (suppl. K): 88-93.

Remarachin, JA; Jacobson, JA; Szabo, P; MacLouf, J; Creminon, C; Weksler, BB. (1994). Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic muscle cells. *Arterioscl Tromb.*; 14 (7): 1021-2031.

Rizzoni D, Muiesan ML, Porteri E, Castellano M, Zulli R, Bettoni G, Salvetti M, Monteduro C, Agabiti-Rosei E. (1997). Effects of long-term antihypertensive treatment with lisinopril on resistance arteries in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *J Hypertens.*; 15(2): 197-204.

Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Muiesan P, Giulini SM, Agabiti-Rosei E. (1996). Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension*; 28(5): 785-90.

Rizzoni, D; Castellano, M; Porteri, E; Bettoni, G; Muiesan, ML; Agabiti-Rosei, E. (1994). Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. *Am J Physiol.*; 7 (2): 193-200.

Rodríguez-Mañas, L.; Sánchez-Ferrer, C.F.; Pareja, A.; Casado, M.A.; Arribas, S., Salaices, M.; Marín, J. (1994). Neurogenic component of ouabain-evoked contractions is modulated by the endothelium. *Hypertension*; 23:10-17.

Rodríguez-Mañas, L; Pareja, A; Sánchez-Ferrer, CF; Casado, MA; Salaices, M; Marín, J. (1992). Endothelial role in ouabain-induced contraction in guinea pig carotis arteries. *Hypertension*; 20: 674-681.

Romero JC, Reckelhoff JF. (1999). State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*; 34(4 Pt 2): 943-9.

Rossi M, Taddei S, Fabbri A, Tintori G, Credidio L, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti A, Giusti C. (1997). Cutaneous vasodilation to acetylcholine in patients with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 29(3): 406-11.

Rossi, G; Manunta, P; Hamlyn, JM; Pavan, E; Di Toni, R; Semplicini, A; Pessina, AC. (1995). Immunoreactive endogenous ouabain in primary aldosteronism and essential hypertension.: relationship with plasm renin, aldosterone and blood pressure levels. *J Hypertens.*; 13 (10): 1181-1191.

Rossoni, L.V.; Cunha V., França, A.; Vassallo, D.V. (1999). The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 34: 887-892

Rossoni, L.V.; dos Santos, L.; Barker, L.A.; Vassallo, D.V. (2003). Ouabain changes arterial blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine in L-NAME induced hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 41: 105-116.

Rossoni, L.V.; Pinto, V.D.; Vassallo, D.V. (2001). Effects of small doses of ouabain on arterial blood pressure of anesthetized hypertensive and normotensive rats. *Br J Med Biol Res.*; 4:1065-1077.

Rossoni, L.V.; Salaices, M.; Marín, J.; Vassallo, D.V.; Alonso, M.J. (2002a). Alterations on vascular reactivity to phenylephrine and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and expression in hypertension induced by chronic administration of ouabain. *Br J Pharmacol.*; 135: 771-781.

Rossoni, L.V.; Salaices, M.; Miguel, M.; Briones, A.M.; Barker, L.A.; Vassallo, D.V.; Alonso, M.J. (2002b). Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. *Am J Physiol.*; 283: H2110-H2118.

Rubanyi, GM. (1993). The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 22 (suppl 4): 1-14.

Rubanyi, GM; Vanhoutte, PM. (1986). Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol.*; 250 (19): H815-H821.

Saijonmaa, O; Ristimaki, A; Fyhrquist, F. (1990). Atrial natriuretic peptide, nitroglycerine, and nitroprusside reduce basal and stimulated endothelin production from culture endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*; 173 (2): 514-520.

Salvemini, D. (1997). Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell Mol Life Sci.*; 53 (7): 576-582.

Sánchez-Ferrer, C.F.; Fernández-Alfonso, M.S.; Ponte, A.; Casado, M.A.; González, R., Rodríguez-Mañas, L.; Pareja, A.; Marín, J. (1992). Endothelial modulation of the ouabain-induced contraction in human placental vessels. *Hypertension*; 71: 943-950.

Santos, RA; Brosnihan, KB; Jacobsen, DW; Di Corleto, PE; Ferrario, CM. (1992). Production of angiotensin (1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension*; 19 (Suppl 2): II56-II61.

Sanz-Rosa D, Oubina MP, Cediél E, de Las Heras N, Vegazo O, Jimenez J, Lahera V, Cachofeiro V. (2005). Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 288(1): H111-5.

Sato, K; Aoki, K. (1988). Biophasic contraction induced by ouabain in human umbilical arteries. *Eur J Pharmacol.*; 158 (3): 299-302.

Saunders R, Scheiner-Bobis G. (2004). Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. *Eur J Biochem.*; 271(5): 1054-62.

Schiffrin EL. (1996). The endothelium of resistance arteries: physiology and role in hypertension. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*; 54(1): 17-25.

Schmidt HH, Murad F. (1991). Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun.*; 181(3): 1372-7.

Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. (1998). Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension*; 32(1): 59-64.

Schorr, K. The effect of prostaglandins and tromboxane A<sub>2</sub> on coronary vessel tone – mechanisms of action and therapeutic implications. (1993). *Eur Heart J.*; 14 (suppl. I): 34-41.

Shah, Jr; Laredo, J; Hamilton, BP; Hamlyn, JM. (1998). Different signalling pathways mediate stimulated secretion of endogenous ouabain and aldosterone from bovine adrenocortical cells. *Hypertension*; 31 (1 Pt 2): 463-468.

Shimokawa, H; Flavahan, NA; Lorenz, RR; Vanhoutte, PM. (1988). Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its actions in coronary arteries of the pig. *Br J Pharmacol.*; 95 (4): 1197-1203.

Simonson, MS; Dunn, MJ. (1990). Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J.*; 4 (12): 2989-3000.

Skou J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta.*; 23(2): 394-401.

Skou, J.C. & Esmann, M. (1992). The Na,K ATPase. *J Bioenerg Biomembr.*; 24: 249-261.

Smeda, JS; Lee, RM; Forrest, JB. (1988). Structural and reactivity alterations of the renal vasculature of spontaneously hypertensive rats prior to and during established hypertension. *Circ Res.*; 63 (3): 518-533.

Smith CW, Pritchard K, Marston SB. (1987). The mechanism of Ca<sup>2+</sup> regulation of vascular smooth muscle thin filaments by caldesmon and calmodulin. *J Biol Chem.*; 262(1):116-22.

Smith, TL; Hutchins, PM. (1979). Central hemodynamics in the development stage of spontaneously hypertension in the unanesthetized rat. *Hypertension*; 5 (1): 508-517.

Smith, WL. (1992). Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol.*; 263: F181-F191.

Sofola OA, Knill A, Hainsworth R, Drinkhill M. (2002). Change in endothelial function in mesenteric arteries of Sprague-Dawley rats fed a high salt diet. *J Physiol.*; 543(Pt 1): 255-60.

Songu-Mize, E.; Bealer, S.L.; Caldwell, W. (1982). Effect of AV3V Lesions on development of DOCA-Salt hypertension and vascular Na<sup>+</sup>-Pump activity. *Hypertension*; 4: 575-580.

Songu-Mize, E.; Vassallo, D.V.; Rashed, S.M.; Varner, K.J. (1995). Ouabain amplifies contractile responses to phenylephrine in rat tail arteries in hypertension. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.*; 6: 309-319.

Songu-Mize, E; Bealer, SL; Caldwell, RW. (1987). Effect of Doca-salt hypertension treatment duration and anteroventral third ventricle lesions on a plasma-born sodium pump inhibitor in rats. *J Hypertens.*; 5: 461-467.

Sunano S, Watanabe H, Tanaka S, Sekiguchi F, Shimamura K. (1999) Endothelium-derived relaxing, contracting and hyperpolarizing factors of mesenteric arteries of hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol.*; 126(3): 709-16.

Suzuki, H; Swei, A; Zweifach, BW; Schmid-Schonbein, GW. (1995). In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*; 25: 1083-1089.

Sweadner KJ, Rael E. (2000). The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics*; 68(1): 41-56.

Sweadner, K.J. (1989) Isozymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim Biophys Acta*; 988:185-220.

Taddei S, Viridis A, Mattei P, Salvetti A. (1993). Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*; 21 (6 Pt 2): 929-33.

Taddei, S.; Ghiadoni, L.; Viridis, A.; Buralli, S.; Salvetti, A. (1999). Vasodilatation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive rats. *Circulation*, 100:1400-1405.

Tamura, M; Lam, TK; Inagami, T. (1987). Specific endogenous Na,K-ATPase inhibitor purified from bovine adrenal. *Biochem Biophys Res Commun.*; 149 (2): 468-474.

Tare, M; Parkington, HC; Colemn, HA; Neild, TO; Dusting, GJ. (1990). Hyperpolarizing and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from endothelium. *Nature*; 346: (6279): 69-71.

Tasaka, K; Kitazumi, K. The control of endothelin-1 secretion. (1994). *Gen Pharmacol.*; 25 (6): 1059-1069.

Taylor HJ, Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM. (1998). Inhibition of the gap junctional component of endothelium-dependent relaxations in rabbit iliac artery by 18-alpha glycyrrhetic acid. *Br J Pharmacol.*; 125(1): 1-3.

Tertyshnikova, S; Yan, X; Fein, A. (1998). cGMP inhibits IP<sub>3</sub>- induced Ca<sup>2+</sup> release in intact rat megakaryocytes via cGMP- and cAMP-dependent protein kinases. *J Physiol.*; 512 (pt 1): 89-96.

Toda, N. (1980). Mechanism of ouabain-induced arterial muscle contraction. *Am J Physiol.*; 239:H404-H411.

Toda, N. (1984). Endothelium-dependent relaxation induced by angiotensin II hystamine in isolated arteries of dog. *Br J Pharmacol.*; 81 (2): 301-307.

Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Liu M, Sakuma I, Kitabatake A, Kanno M. (1999). Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions. *J Vasc Res.*;36(4):311-20.

Touyz RM, Schiffrin EL. (2001). Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of

phospholipase-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens.*; 19(7): 1245-54.

Tucker, DC; Johson, AK. (1984). Development of autonomic control of heart rate in genetically hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol.*; 246: 570-577.

Ungvari Z, Koller A. (2000). Endothelin and prostaglandin H(2)/thromboxane A(2) enhance myogenic constriction in hypertension by increasing Ca(2+) sensitivity of arteriolar smooth muscle. *Hypertension*; 36(5): 856-61.

Ussing H. H. (1949). Transport of ions across cellular membranes. *Physiol Rev*; 29: 127-155.

van Gorp, AW; Schenau, DS; Hoeks, AP; Boudier, HA; De Mey, JG; Reneman, RS. (2000). In spontaneously hypertensive rats alterations change in aortic wall properties precede development of hypertensive. *Am J Physiol.*; 278: H1241-H1247.

Vanhoutte PM, Lorenz RR.(1984). Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibitors and the adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 6 Suppl 1: S88-94.

Vanhoutte PM, Scott-Burden T. (1994). The endothelium in health and disease. *Tex Heart Inst J.*; 21(1): 62-7.

Vanhoutte, PM. Other endothelium-derived vasoactive factors. (1993). *Circulation*; 87 (Suppl V): V9-V17.

Vassalle, M. (1987). Contribution of the Na, K-pump to the membrane potential. *Experientia*; 43: 1135-1140.

Vassallo, D.V.; Songu- Mize, E.; Rossoni, L.V.; Amaral, S.M.C. (1997). Effects of ouabain on vascular reactivity. *Br J Med Biol Res.*; 30: 545-552.

Vázquez-Pérez, S; Navarro-Cid, J; las Heras, N; Cediél, E; Sanz-Rosa, D; Ruilope, LM; Cachofeiro, V; Lahera, V. (2001). Relevance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the effects of hypertension on rat coronary relaxations. *J Hypertens.*; 19: 539-545.

Virdis A, Colucci R, Fornai M, Blandizzi C, Duranti E, Pinto S, Bernardini N, Segnani C, Antonioli L, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M. (2005). Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther.*; 312(3): 945-53.

Vulpis, V; Sublimi-Saponetti, L; Forte, D; Ricci, S; Nazzaro, P; Pirrelli, A. (1989). In vitro reactivity of the aorta of SHR rats and Wistar rats, in the various developmental phases of arterial hypertension: role of the endothelium. *Cardiologia*; 34 (10): 835-840.

Wang Y, Marsden PA. (1995). Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol.*; 34: 71-90.

Ward, SC; Hamilton, BP; Hamlyn, JM. (2002). Novel receptors for ouabain: studies in adrenocortical cells and membrane. *Hypertension*; 39 (pt 2): S36-S42.

Watanabe T, Barker TA, Berk BC. (2005). Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. *Hypertension*; 45(2): 163-9.

Webb RC. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.*; 27(1-4):201-6.

Webb, R.C. & Bohr, D.F. (1978). Potassium-induced relaxation as an indicator of  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  activity in the vascular smooth muscle. *Blood Vessels*; 15:198-207.

Webb, R.C. & Bohr, D.F. (1979). Potassium relaxation of vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels*, 16:71-79.

Welch WJ, Wilcox CS. (2001). AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. *Kidney Int.*; 59(4): 1257-63.

Wheeler MA, Smith SD, Garcia-Cardena G, Nathan CF, Weiss RM, Sessa WC. (1997). Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J Clin Invest.*; 99(1): 110-6.

Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vazquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob S. (2001). Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 281(5): R1343-60.

Wu, R.; Millette, E.; Wu, L.; De Champlain, J. (2001). Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens.*; 19:741-748.

Xavier, F.E.; Rossoni, L.V.; Alonso, M.J.; Balfagón, G.; Vassallo, D.V.; Salaices, M. (2004b). Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in  $\alpha$ -adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.*; 143: 215-225.

Xavier, F.E.; Salaices, M.; Marquez-Rodas, I.; Alonso, M.J.; Rossoni, L.V.; Vassallo, D.V.; Balfagón, G. (2004a). Neurogenic nitric oxide release increases in mesenteric arteries from ouabain hypertensive rats. *J Hypertension*; 22: 949-957.

Xavier, F.E.; Yogi, A.; Callera, G.E.; Tostes, R.C.; Alvarez, Y.; Salaices, M.; Alonso, M.J.; Rossoni, L.V. (2004c). Contribution of the endothelin and renin-angiotensin systems to the vascular changes in rats chronically treated with ouabain. *Br J Pharmacol.*; 143(6): 794-802.

Xie QW, Cho H, Kashiwabara Y, Baum M, Weidner JR, Elliston K, Mumford R, Nathan C. (1994). Carboxyl terminus of inducible nitric oxide synthase. Contribution to NADPH binding and enzymatic activity. *J Biol Chem.*; 269(45): 28500-5.

Xie, J.; Wang, Y.; Summer, W.R.; Greenberg, S.S. (1993). Ouabain enhances basal release of nitric oxide from carotid artery. *Am J Med Sci.*; 305: 157-163.

Yamada, K.; Goto, A.; Hui, C.; Sugimoto, T. (1990). Endogenous digitalis-like factor as a stimulator of endothelin secretion from endothelial cells. *Biochem Biophys Res.*; 172: 178-183.

Yamada, K.; Goto, A.; Nagoshi, H.; Terano, Y.; Omata, M. (1997) Elevation of ouabainlike compound levels with hypertonic sodium chloride load in rat plasma and tissues. *Hypertension*; 30(part 1): 94-98.

Yanagesawa, M; Kurihara, S; Kimura, S; Tomobe, Y; Kobayashi, M; Mitsui, Y; Yazaki, Y; Goto, K; Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. *Nature*; 322: 411-415.

Yanes L, Romero D, Iliescu R, Cucchiarelli VE, Fortepiani LA, Santacruz F, Bell W, Zhang H, Reckelhoff JF. (2005). Systemic arterial pressure response to two weeks of Tempol therapy in SHR: involvement of NO, the RAS, and oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 288(4): R903-8.

Yokoyama H, Averill DB, Brosnihan KB, Smith RD, Schiffrin EL, Ferrario CM. (2005). Role of blood pressure reduction in prevention of cardiac and vascular hypertrophy. *Am J Hypertens.*; 18(7): 922-9.

Yuan, C.M.; Manunta, P.; Hamlyn, J.M., Chen, S.; Bohlen, E.; Yeun, J.; Haddy, F.J.; Pamnani, M.B. (1993). Long-term ouabain administration produces hypertension in rats. *Hypertension*; 22: 178-187.

Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Etayo JC, Diez J. (2000). Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*; 35(5): 1055-61.

Zerrouk A, Champeroux P, Safar M, Brisac AM. (1997). Role of endothelium in the endothelin-1-mediated potentiation of the norepinephrine response in the aorta of hypertensive rats. *J Hypertens.*; 15(10): 1101-11.

Zhan CD, Sindhu RK, Pang J, Ehdaie A, Vaziri ND. (2004). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *J Hypertens.*; 22(10): 2025-33.

Zhang H, Schmeisser A, Garlich CD, Plotze K, Damme U, Mugge A, Daniel WG. (1999). Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res.*; 44(1): 215-22.

Zhang, J. & Leenen, F.H.H. (2001). AT(1) receptor blockers prevent sympathetic hyperactivity and hypertension by chronic ouabain and hypertonic saline. *Am J Physiol.*; 280: H1318-H1323.

Zimmerman, JB; Robertson, D; Jackson, EK. (1987). Angiotensin II- noradrenergic interactions in renovascular hypertensive dogs. *J Clin Investig.*; 80 (2): 43-45.



